MEMORIAS
DO
INSTITUTO BUTANTAN

1938-39

TOMO XII

São Paulo, Brasil
Caixa Postal 65

MEMORIAS
DO
INSTITUTO BUTANTAN

1938-39

TOMO XII

São Paulo, Brasil
Caixa Postal 65

INDICE

NOTICIARIO

O presente numero das "Memorias" contem 38 artigos originais, relativos às principais pesquisas realizadas nas secções tecnicas do Instituto. Nele tambem inserimos um artigo de colaboração do prof. C. de Mello Leitão (do Museu Nacional do Rio de Janeiro), o qual vem fazendo uma revisão nas coleções aracnologicas do Butantan.

Atualmente, o pessoal superior dos serviços tecnicos do Instituto Butantan é o seguinte:

Diretor — Dr. Jayme Cavalcanti

Assistentes-chefes — Drs. Alcides Prado
José Bernardino Arantes
Sebastião de Camargo Calazans
Paulo Monteiro de Barros Marrey
Joaquim Hugo Travassos da Rosa
Cicero de Moura Neiva
Flavio O. R. da Fonseca
Thales Martins
Moacyr de Freitas Amorim
Francisco de Paula Barata Ribeiro

Assistentes — Drs. Jandyra Planet do Amaral
Ariosto Büller Souto
Aristides Vallejo Freire
José Ribeiro do Valle
Armando Taborda
Antonio de Salles Teixeira
Leonidas de Toledo Piza
Paulo Rath de Souza
Fernando Paes de Barros
Lourival Francisco dos Santos
Plinio de Lima

Toda a correspondência cientifica, relativa às "Memorias", deve ser dirigida ao

EDITOR, MEMORIAS DO INSTITUTO BUTANTAN
CAIXA POSTAL, 65
SÃO PAULO, BRASIL

598.12

NOTAS OFIOLOGICAS

1. Sobre as serpentes do grupo *Bothrops lansbergii*, com a descrição de uma nova especie

POR

ALCIDES PRADO

As serpentes deste grupo são especies americanas, de cauda não preensil, que possuem uma area de dispersão compreendida entre 5° de latitude S. e 20° de latitude N.

Caracterizam-se em geral, por um apendice rostral proboscidiforme e pelo tamanho relativamente curto do corpo.

São conhecidas vulgarmente por "Chatilla" e "Tamagá" no Sul do Mexico e por "Tayas" na Colombia, paises em que frequentemente ocorrem.

Dêste grupo tão controvertido, após as discussões de Dunn e Amaral, foram separadas definitivamente as seguintes especies: *Bothrops lansbergii* (SCHLEGEL), *Bothrops nasuta* BOCOURT e *Bothrops ophryomegas* BOCOURT.

Mais tarde, foi o grupo acrescido de mais uma especie, procedente de La Pedrera, na Colombia, a *Bothrops hyoprora,* descrita por Amaral, que, na mesma ocasião, organizou a seguinte chave sinotica:

A. internasais duplas:

1. Cantais duplas; focinho proboscidiforme; ventrais 127; subcaudais 44 .... *hyoprora*
(Distribuição: fronteira colombo-brasileira).

B. Internasais simples:

1. Cantais simples; focinho proboscidiforme; ventrais 130-145; subcaudais 24-35 .... *nasuta*
(Distribuição: terras baixas do Oeste do Equador e da Colombia e do Leste da America Central).

2. Cantais simples; focinho algo ereto: ventrais 147-159; subcaudais 28-41 .... *lansbergii*

   (Distribuição: distritos semi-aridos do Noroeste da America do Sul, através da America Central até o Sul do Mexico).

3. Cantais duplas; focinho não ereto; ventrais 166-173; subcaudais 32-39 .... *ophryomegas*

   (Distribuição: distritos aridos do Oeste da America Central).

Sobre a ocorrencia de qualquer delas no Brasil, não ha sinão informações muito vagas. Com a descrição da especie *Bothrops pessoai*, que presumo seja nova, ficará assinalada a presença de um representante deste grupo entre nós.

De inicio, tive dificuldade em considerá-la como *Bothrops*, devido a certas variações estruturais: carinas das escamas, por exemplo, curtas e espessadas atrás; placas supra-oculares divididas pouco abaixo do meio.

Verificando, depois, que, alem de outros caracteres morfologicos bem nitidos, os dentes pterigoideos transpõem em baixo a articulação transverso-pterigoidea, pude, com segurança, colocá-la entre os representantes do genero *Bothrops*.

Esta especie ainda não adulta, foi-me remetida ha tempos, conservada em alcool. Procede de zona de floresta das margens do rio Parauary, a Sudoeste do Estado do Amazonas, Brasil.

Bothrops pessoai, sp. n.

♂ — Cabeça larga; focinho curto, com a ponta levantada; corpo relativamente grosso e forte; cauda moderada, não preensil.

Focinho pontudo, com o "canthus rostralis" bem marcado; olho moderado, rostral uma vez e meia tão alta quanto larga; nasal dividida; internasais conspicuas, separadas entre si, na linha mediana, por tres series de escamas, da rostral por duas series, porém, em contacto com a nasal anterior; cantais pouco mais longas e mais largas do que as precedentes; supraoculares algum tanto grandes, rugosas, divididas pouco abaixo do meio e separadas entre si por cerca de quatro series de escamas; duas preoculares, sendo que a de cima, longa e larga, contribue com seu bordo latero-superior para a formação do "canthus", tres postoculares e uma subocular separada das supralabiais por algumas escamas; 7 supralabiais, 2.ª separada da fosseta lacrimal por uma serie de pequenas escamas, 5.ª maior; temporais pequenas e fortemente carinadas; 9 infralabiais, 1.ª e 2.ª de cada lado, em contacto com a mental anterior respectiva; mentais posteriores ausentes, confundem-se com as gulares. Escamas dorsais longas

e lanceoladas, em 23 filas, fortemente carinadas: carinas curtas, espessadas e salientes atrás, não atingem a extremidade posterior das escamas. Ventrais 128; anal inteira; subcaudais 57 (=43+5/5+1+4/4+1+2/2+1).

Pardo-cinza em cima, com uma serie lateral de manchas trapezoides umas e romboidais outras, pardo-negras, que, geralmente, se unem na linha vertebral; as ultimas, das mesma côr, sobre a cauda, transformam-se quasi em faixas, entrecortadas por outras mais estreitas, cinza-claras; cabeça pardo-cinza, com uma linha mais clara, muito tenue, que vai, de cada lado, do angulo posterior do olho à comissura dos labios; outra semelhante, em cada flanco, por toda a extensão do corpo; ventre cinza, inteiramente salpicado de pardo.

Comprimento total 475 mm.; cauda 85 mm..

Holotipo, macho, sob o N.º 10.004, na coleção do Instituto Butantan, S. Paulo.

Procedencia: Rio Parauary, Est. do Amazonas, Brasil.

Colecionado por C. Worontzow, em janeiro de 1937.

Oferecido pelo prof. Samuel Pessoa, catedratico de Parasitologia da Faculdade de Medicina de S. Paulo, a quem o nome da especie é dedicado.

A especie aqui tratada pertence ao grupo onde se incluem: *Bothrops lansbergii*, *Bothrops nasuta*, *Bothrops ophryomegas* e *Bothrops hyoprora*, sendo afim de *B. nasuta*, da qual difere por não possuir apendice rostral triangular à extremidade do focinho, pelas internasais que não se tocam na linha mediana, pelas supraoculares que são divididas, pelo numero das ventrais que é de 128 ao invés de 130 e geralmente mais, pelo numero das subcaudais que é de 57 e não de 24-35, emfim pelo tamanho e pelo colorido geral, além de varias diversidades estruturais.

BIBLIOGRAFIA

Duméril, M. A. & Bocourt, M. — Recherches Zoologiques, Paris: 943.1870.
Boulenger, G. A. — Catalogue of the Snakes in the British Museum 3:546.1896.
Ihering, R. — Revista do Museu Paulista 8:362.1911.
Brazil, V. — "A Defesa contra o Ofidismo": 49.
Amaral, A. do — Bull. Antiv. Inst. of America 1(1):22.1927.
Dunn, E. R. — Bull. Antiv. Inst. of America 2(2):30.1928.
Barbour, T. & Loveridge, A. — Bull. Antiv. Inst. of America 3(1):1.1929.
Amaral, A. do — Bull. Antiv. Inst. of America 3(1):19.1929.
Amaral, A. do — Mem. Inst. Butantan 4:237.1930.
Picado, C. — Mem. Inst. Butantan 8:389.1933/34.
Amaral, A. do — Mem. Inst. Butantan 9:222.1935.
Maria, I. N. — Rev. de la Acad. Colombiana de Cienc. Exactas, Fis. y Nat. 2(7):417.1938

(Trabalho da Secção de Ofiologia e Zoologia Medica do Instituto Butantan, dezembro de 1938. Dado à publicidade em 1939).

Mem. Inst. Butantan
Vol. XII — 1938-39

Bothrops pessoai, sp. n.

595.46

NOTAS SOBRE O *RHOPALURUS DORSOMACULATUS* PRADO

POR

ALCIDES PRADO

De um grande lote de escorpiões recebido de Goiás, comecei por estudar a especie cujo nome encima estas notas, a qual foi em nota previa publicada *in* Ann. Paul. de Med. e Cir. *35*(4):347.1938.

As especies locais do genero *Rhopalurus*, são hoje muito bem estudadas, graças aos trabalhos de C. de Mello-Leitão, do Museu Nacional, a quem muito se deve no campo da aracnologia.

Rhopalurus dorsomaculatus Prado

♀ — Cefalotorace pardo-enegrecido, sem brilho, com uma grande mancha antracoide, irregular, que envolve parte dos olhos medianos. Tergitos quasi da mesmo côr; cada um com uma mancha antracoide, tambem irregular, do lado direito da crista mediana; no ultimo, essa mancha é menor e está colocada do lado oposto. Esternitos pardo-enegrecidos, com exceção do I, que é pardo-amarelado. Cauda quasi uniformemente pardo-escura, sem brilho; face dorsal dos segmentos I a III, pardo-avermelhada; dos segmentos IV e V pardo-enegrecida; côr antracoide, ventral, destes dois ultimos; vesicula pardo-avermelhada, brilhante, com a ponta do aculeo infuscada. Mandibulas pardo-amareladas, brilhantes, distalmente enegrecidas. Palpos pardo-escuros, com tonalidade pardo-avermelhada da tibia e da mão; dedos igualmente pardo-enegrecidos e com as pontas respectivas pardo-avermelhadas. Patas pardo-amareladas. Operculo e orgãos pectineos pardo-amarelados, palidos.

Cefalotorace fortemente granuloso, com granulações maiores dispostas em cristas; cômoro ocular com um sulco mediano profundo.

Tergitos grosseiramente granulosos; porção intercalar do I ao VI, bem distinta, e reduzida a duas metades no VII, finamente granulosa; crista mediana forte, do I ao VI; apenas basilar e com duas outras laterais, simetricas, no VII; cristas laterais rudimentares do III ao VI.

Esternitos lisos em sua maior extensão; esternito I, com areas laterais deprimidas, densa e finamente granulosas; uma formação triangular em relevo, lisa, pontilhada e pilosa; porções intercalares de todos os segmentos bem visiveis; esternito V grosseiramente granuloso, com 4 cristas da mesma natureza.

Cauda forte, quasi 5 vezes mais compridas do que o cefalotorace, alargando-se ligeiramente no sentido apicilar; dorsalmente granulosa e mais fortemente na porção latero-ventral; cristas granulosas em numero de 10, nos segmentos I e II; face dorsal dos segmentos IV e V profundamente deprimida; vesicula com aculeo longo e curvo; denticulo subaculear saliente, em forma de ponta de prego.

Mandibulas pouco salientes, com um dente no bordo inferior do dedo imovel.

Palpos: femur e tibia com cristas granulosas; mão levemente achatada do lado externo e convexa do interno, pouco mais larga do que a tibia e com cristas visiveis; dedo movel levemente lobado e tão longo quanto o segmento caudal; granulações dos gumes dos dedos dispostas em 8 fileiras.

Patas ligeiramente granulosas e com cristas nitidas.

Orgãos pectineos alargados na base, e com 20/21 dentes.

Medidas: comprimento total, 92 mm.; cefalotorace, 11 mm.; preabdome, 27 mm.; cauda, 54 mm.. Mão, 4,5 x 7 mm.; dedo movel, 12 mm..

Habitat: Cana Brava (Nova Roma), Estado de Goiás, Brasil.

Colecionado par Blaser.

Holotipo, femea, em vidro sob o No. 35, na coleção do Instituto Butantan, S. Paulo.

— Esta especie é afim de *Rhopalurus borelli* Pocock e de *Rhopalurus iglesiasi* Werner. Distingue-se da primeira pela coloração geral pardo-enegrecida, a que se juntam manchas antracoides, nitidas, distribuidas no dorso; pelo tamanho da cauda em relação ao cefalotorace, numa proporção inferior a 5 vezes o comprimento daquela; pelo numero de dentes pectineos que é de 20-21, ao invés de 19-20; finalmente, pelo comprimento total, que é evidentemente maior. Difere da segunda, pelo colorido geral, que se revela pela presença de manchas antracoides no dorso e ausencia de duas elevações basilares do dorso da vesicula.

(Trabalho da Secção de Ofiologia e Zoologia Medica do Instituto Butantan, setembro de 1938).

Fig. 1

Tronco.

Fig. 2

Cauda.

616.968.5

NOTAS DE ACAREOLOGIA

XXV. Os *Laelaptidae* gigantes, parasitas de roedores sul-americanos; genero e especies novos (*Acari*).

POR

FLAVIO DA FONSECA

(com 30 figuras no texto)

SUMARIO

Das cento e tantas familias incluidas na ordem *Acari* Leach, 1817, é a familia *Laelaptidae* Berlese, 1892, a que se deixa decompor em maior numero de generos, devendo orçar em perto de uma centena os que lhe têm sido até hoje atribuidos. Vitzthum, em 1931 (1), citou 78 generos a ela filiados. Deste numero cerca de um quarto é composto de generos cujas especies parasitam vertebrados, principalmente mamiferos; foram reunidos, em grande parte, em chave muito pratica, por Ewing, em 1929 (2).

Entre os generos parasitas sobresai, pela frequencia com que são encontradas as suas especies, o genero tipo, *Laelaps* C. L. Koch, 1836, que inclúi numerosas formas parasitas de roedores, algumas das quais cosmopolitas. O numero de especies incluidas no genero *Laelaps, sensu strictu,* deve ultrapassar trinta; é este, nesta familia, sem duvida o grupo mais numeroso, tendo os seus representantes, sido objeto de estudo de Ljung, Koch, Berlese, Oudemans, Trägardh, Vitzthum, Hirst, Ewing e outros.

Nos ultimos 12 anos os tres ultimos acareologistas citados e nós mesmo nos vimos compelidos a criar cerca de 15 novos generos para certas formas da familia *Laelaptidae* encontradas principalmente sobre roedores.

O criterio utilizado para a distinção generica é multiplo: dimensões, forma do corpo, pilosidade, numero de cerdas da placa genito-ventral, forma desta placa, presença ou ausencia de espinhos simples ou bifidos nas coxas, coroa de cerdas no *pulvillus* das mandibulas e até presença ou ausencia de escultura no escudo dorsal das femeas.

Relações do novo genero

Dentre os generos recentemente criados, um, *Macrolaelaps* Ewing, 1929, que até agora incluia os maiores *Laelaptidae* parasitas de vertebrados, será objeto de nossa atenção especial.

Criando o genero *Macrolaelaps,* deu-lhe Ewing, em 1929 (2), a seguinte diagnose: "Body as a whole clothed with stout setae, which tend to become thickly set along the lateral margins. *Chelicerae* of female very large, somewhat swollen and with a brush of setae situated near the base of the movable arm. Dorsal plate covering most of the body and irregularly sculptured over the region of the cephalothorax. Sternal plate large, heavily chitinized and extending well between third coxae. Genito-ventral plate of female large, much expanded beneath fourth coxae and with four pairs of setae. Anal plate almost circular, with three setae, the last or unpaired one, being much the largest. Metapodal plates small to minute. First and second pairs of legs enlarged but not calcarate. First femora with long spines above. Type: *Laelaps sanguineus* Vitzthum".

Em 1933, Ewing (3) propôs para o mesmo genero a diagnose seguinte: "Body stout, but longer than broad, not subcircular; well clothed with short, spine-like setae; dorsal plate of female sculptured. *Chelicerae* each with a brush of setae attached near the base of the movable arm; fixed arm without recurved, fang-like seta. Sternal plate of female broad, with two pairs of pores and three pairs of setae; genito-ventral plate not reaching anal plate; anal plate as long

as broad, broadly rounded in front and pointed behind, and provided with two paired and one unpaired setae. Legs stout, provided with spine-like setae; each coxae with one or two short, peg-like spines. Type species: *Laelaps sanguineus* VITZTHUM".

O primeiro fato a chamar a atenção nas diagnoses de Ewing é o nome da especie tipo: *Laelaps sanguineus;* trata-se de *nomen nudum,* derivando da confusão com *Laelaps* (*Laelaps*) *sanguisugus* VITZTHUM, 1926 (4), a qual passa, portanto, a especie tipo, como *Macrolaelaps sanguisugus* (VITZTHUM, 1926).

Como diferenças entre as duas diagnoses nota-se que, na segunda das apresentadas por Ewing, este pesquisador não mais assinala a existencia de quatro cerdas na placa genito-ventral, nem a larga expansão posterior desta placa, da qual passa apenas a dizer que não atinge a anal. Tambem não diz mais que as placas metapodais (inguinais) sejam muito pequenas. Assinala a existencia de 1-2 espinhos curtos em cada coxa; diz ainda que os pêlos do corpo são espiniformes, curtos.

Com esta segunda diagnose acomoda Ewing no genero *Macrolaelaps* as duas especies por êle assinaladas, a saber: *M. sanguineus* (VITZTHUM) (syn.: *M. sanguisugus*) e *M. peruvianus* EWING (5).

Que ambas esta sespecies apresentam afinidades é manifesto, principalmente em relação às grandes dimensões, que alcançam 1530 µ em *M. sanguisugus* e 1900 µ em *M. peruvianus,* bem como ao comprimento das cerdas das placas ventrais e à ocorrencia de cerdas longas no femur I. É, todavia, fora de duvida que a especie de Ewing apenas apresenta na genito-ventral, que é menos expandida atrás, um par de cerdas, o genital, ficando as cerdas da região ventral já implantadas no tegumento descoberto. Além disso, a forma do bordo anterior da esternal tambem difere nas duas especies; apresentam ambas esternal longa, alcançando a base do tritosterno, mas a zona anterior da placa é estreitada, em forma de projeção mediana, na especie sul-americana, ao passo que a largura é muito mais uniforme na especie javanesa. Outra diferença a assinalar entre as duas especies é a que se depreende da comparação da figura de Ewing, cuja descrição especifica é muito deficiente, com a figura e a modelar descrição de Vitzthum relativamente às cerdas das coxas: ao passo que a especie sul-americana apresenta cerda curta distal na coxa I, a especie de Java a tem muito longa, quasi do tamanho das cerdas esternais; por outro lado, *M. peruvianus* tem a cerda longa posterior na coxa II, o que veremos ser carater constante das especies sul-americanas, ao passo que *M. sanguisugus* tem espinho nesta região. Outra diferença a acentuar é a do comprimento do tritosterno, longo na especie de Ewing e curto na de Vitzthum.

No mesmo trabalho de Vitzthum em que é descrita a especie tipo do genero *Macrolaelaps* (4), é tambem descrita, sob o nome de *Laelaps* (*Laelaps*) *sculptu-*

ratus, uma outra especie, tambem de Java, muito proxima de *Macrolaelaps sanguisugus*, dela diferindo pelas menores dimensões, que apenas alcançam 1340 μ e por pequenos pontos de importancia apenas especifica, pelo que deverá tambem ser incluida no genero *Macrolaelaps*. As diferenças e afinidades observadas entre *M. sculpturatus* e *M. peruvianus* são as mesmas já notadas a proposito da *M. sanguisugus*, exceção feita para a cerda da coxa I, que não é tão longa em *M. esculpturatus* e para o tritosterno, que é longo nesta especie.

O estudo por nós empreendido no presente trabalho, abrangendo oito diferentes especies de *Laelaptidae* gigantes do Brasil e da Republica Argentina, além da especie peruana, deixa-nos a nitida impressão de existencia de um grupo de especies sul-americanas bastante homogeneo para figurar como genero independente, embora manifestando afinidade grande, por um lado, com o genero *Macrolaelaps*, cuja especie tipo é *M. sanguisugus* e, por outro, com o genero *Laelaps*.

Este grupo de especies sul-americanas é caracterizado pelas grandes dimensões das especies a êle pertencentes, das quais a menor das por nós observadas, aliás um tanto atipica, mede 1480 μ; a forma da esternal é constantemente a mesma, com projeção anterior estreitada, ocupando a zona pre-esternal do idiosoma, na qual fica implantado o par de cerdas anteriores; a genito-ventral é sempre pouco expandida posteriormente, não dando inserção a outras cerdas, além das do par genital; a cerda posterior da coxa II é sempre mais longa do que as restantes cerdas das coxas, sendo mesmo de regra excepcionalmente longa. As cerdas longas das placas e das patas são flexiveis e não rigidas como nas especies de Java. O *labrum* é sempre lanceolado e não como em *Macrolaelaps sculpturatus* (VITZTHUM), em que é dividido por uma constrição.

No genero sul-americano, assim caracterizado, ficariam incluidas: a especie *Macrolaelaps peruvianus* EWING, 1933, que, apesar da deficiencia da descrição de Ewing, se pode reconhecer como pertencente a este grupo; as especies *Macrolaelaps butantanensis* FONS., 1935, *Macrolaelaps mattogrossensis* FONS., 1935 e *Macrolaelaps brachyspinosus* FONS., 1935 (5). A este grupo se deve tambem acrescentar *Laelaps maximus* BERLESE, 1903 (6), capturada em Montevidéo sobre *Hesperommys vulpinus*, cujas dimensões e caracteres gerais coincidem com os das especies restantes. Embora Berlese, ao se referir ao escudo genito-ventral, o classifique de *nudum*, temos como certo que se refere tão somente à zona ventral da placa citada, não nos sendo possivel reconhecer probabilidade alguma de existencia de um *Laelaptidae* sem o par de cerdas genital.

Tambem *Laelaps versteegi* OUDEMANS, 1904, descrito de *Mus* sp. do Surinam (11) pertence certamente a este genero, como se deduz das suas grandes dimensões e do fato de só apresentar, na placa genito-ventral, o par de cerdas genitais.

É possivel que tambem *Laelaps wolffsohni* OUDEMANS, 1910 deva ficar incluida neste genero, pois Oudemans, em seu *Laelaps* Studiën, o dá como especie proxima de *Laelaps versteegi;* a falta de bibliografia nos impediu, entretanto, de decidir este ponto.

Além dessas especies, descrevemos no presente trabalho mais cinco, sendo, portanto, de 11 o numero de especies até hoje conhecidas, de acôrdo com a seguinte lista:

1. *Gigantolaelaps maximus* (BERLESE, 1903)
2. *Gigantolaelaps versteegi* (OUDEMANS, 1904)
3. *Gigantolaelaps peruvianus* (EWING, 1933)
4. *Gigantolaelaps butantanensis* (FONS., 1935)
5. *Gigantolaelaps mattogrossensis* (FONS., 1935)
6. *Gigantolaelaps brachyspinosus* (FONS., 1935)
7. *Gigantolaelaps oudemansi*, sp. n.
8. *Gigantolaelaps gilmorei*, sp. n.
9. *Gigantolaelaps vitzthumi*, sp. n.
10. *Gigantolaelaps goyanensis*, sp. n.
11. *Gigantolaelaps comatus*, sp. n.

Acreditamos que a distinção especifica das oito ultimas especies acima seja facil de estabelecer a qualquer tempo, prevista já a necessidade de futuramente distingui-las de outras novas especies e de ser apresentada descrição ou redescrição minuciosa. O mesmo não se pode, todavia, dizer de *Gigantolaelaps maximus* (BERLESE), cuja descrição, si bastava quando ainda nada se conhecia das especies sul-americanas, já é hoje insuficiente para distingui-la de varias outras. A mesma consideração é extensiva a *M. peruvianus* EWING, cuja descrição, demasiado sucinta, como aliás todas as deste pesquisador, era bastante para estabelecer distinção no momento da descrição da especie, mas se manifesta insuficiente para comparála com varias das primeiras especies novas que, após a sua, aparecem na literatura.

Tanto quanto podemos deduzir da diagnose de Ewing para o genero *Macrolaelaps*, que conservamos com o seu valor original (1929), e pela literatura de que dispomos, ficaria o genero *Macrolaelaps* EWING, 1929 reservado para as seguintes especies:

Macrolaelaps muricola (TRAGARDH, 1910) (7)
Macrolaelaps giganteus (BERLESE, 1918) (8)
Macrolaelaps ugandanus (HIRST, 1923) (9)

Macrolaelaps giganteus barkeri (HIRST, 1925) (10)
Macrolaelaps grandis (HIRST, 1925) (10)
Macrolaelaps sanguisugus (VITZTHUM, 1926), especie tipo (4)
Macrolaelaps sculpturatus (VITZTHUM, 1926) (4)

Diagnose do genero Gigantolaelaps, gen. n.

Laelaptidae, proximos de *Macrolaelaps* EWING, 1929 e de *Laelaps* KOCH, 1836, de dimensões maiores do que em qualquer outro genero parasita da familia; placa esternal estreita na frente, de modo a constituir uma larga projeção anterior, que ocupa quasi toda ou toda a zona pre-esternal, na qual ficam implantadas as cerdas do par anterior; além dos tres pares habituais de cerdas esternais, podem ainda existir cerdas menores nesta placa; genito-ventral pouco expandida posteriormente, nela só tomando inserção um par de cerdas, o genital; cerda posterior da coxa II sempre mais longa do que as demais cerdas das coxas, sendo mesmo, em geral, extremamente longa; cerdas longas das patas e das placas flexiveis; *labrum* lanceolado.

Especie tipo: *Gigantolaelaps vitzthumi,* **sp. n.**

Descrição do genero

Como já ficou evidenciado do estudo que fizemos paginas atrás entre *Macrolaelaps sanguisugus* (VITZTHUM) e *Macrolaelaps sculpturatus* (VITZTHUM), de um lado, e *Gigantolaelaps peruvianus* (EWING), de outro, o genero *Gigantolaelaps* apresenta maior afinidade com *Macrolaelaps* EWING. Tambem se aproxima do genero *Laelaps* KOCH, do qual o distinguem o aspeto da placa esternal, o numero de cerdas da genital e o comprimento maior das cerdas das placas e de alguns articulos das patas, bem como o aspeto das *peritrematalia*.

O comprimento das especies é sempre grande, ultrapassando o comprimento do idiosoma das ♀♀ em todas as especies, com exceção de *Gigantolaelaps oudemansi,* sp. n., 1700 μ, podendo atingir até mais de 2000 μ, como acontece em *Gigantolaelaps vitzthumi* e em *Gigantolaelaps gilmorei.* Em *Gigantolaelaps oudemansi* o tamanho é menor, não chegando a 1500 μ. A largura é tambem grande, atingindo 1560 μ em *Gigantolaelaps vitzthumi.* As dimensões dos machos são menores do que as das femeas das respectivas especies, sua largura tambem é menor, não havendo arqueamento pronunciado dos ombros, tendo êles conformação geral mais estreitada do que a das femeas.

A placa esternal, sempre muito chitinizada, é reticulada e apresenta em todas as especies a mesma conformação, com larga e forte projeção anterior, cobrindo a zona pre-esternal e atingindo frequentemente a base do tritosterno. Não raro se percebe espessamento dos bordos, principalmente do anterior e dos laterais, bem como vestigios de uma placa pre-esternal. As seis cerdas habituais da esternal são extremamente longas, chegando a posterior a medir 400 μ de comprimento em *Gigantolaelaps comatus*, sp. n.. Fato curioso é o de apresentar uma das especies, *Gigantolaelaps oudemansi*, sp. n., hipertricose na esternal das ♀ ♀, à semelhança do que acontece em *Acanthochela chilensis* EWING, 1933 e *Haemogamasus sternalis* EWING, 1933; em todos os exemplares, aliás numerosos, se verifica a existencia de 3 cerdas suplementares de menor desenvolvimento entre as cerdas do par normal anterior.

As metaesternais são fracamente quitinizadas e apresentam cerdas longas, do mesmo tipo das esternais e flexiveis como estas.

A genito-ventral é sempre pouco expandida posteriormente, de tal forma, que em uma especie, *Gigantolaelaps butantanensis*, só se pode falar de genital, tão pequeno é o seu desenvolvimento. Cerdas não existem no bordo posterior; no maximo, e isto mesmo só em algumas especies em que a zona ventral é mais expandida, se vê que as cerdas proximas da zona ventral, embora implantadas no tegumento descoberto, deprimem o bordo posterior da placa, que fica ondeado. É este um dos melhores caracteres do novo genero e o que nos levou a nele incluir *Laelaps maximus* BERLESE.

O pequeno desenvolvimento da genito-ventral determina o grande afastamento existente entre esta placa e a anal, o oposto, portanto, do que acontece com *Macrolaelaps sculpturatus* (VITZTHUM), em que a proximidade das duas placas lembra o aspecto de *Laelaps echidninus* BERLESE, e, num grau menor, o de *Macrolaelaps muricola* (TRÄGARDH), *Macrolaelaps grandis* (HIRST), *Macrolaelaps ugandanus* (HIRST), *Macrolaelaps barkeri* (HIRST) e *Macrolaelaps giganteus* (BERLESE).

Na anal ha a notar o grande desenvolvimento das cerdas, principalmente da impar, que é flexuosa, e o desenvolvimento relativamente pequeno da zona do *cribrum*, que não ultrapassa de regra a inserção da cerda impar. Esta placa é em geral reticulada e tem angulos antero-externos mais chitinizados.

As inguinais têm desenvolvimento medio, apresentando-se em geral pouco chitinizadas.

Os estigmas têm a situação habitual em *Laelaptidae*, ficando ao nivel do intervalo entre as coxas III e IV. As *peritrematalia* apresentam a particularidade de não se prolongarem para atrás dos estigmas, o que, aliás, tambem acontece em *Macrolaelaps sanguisugus* (VITZTHUM), ao contrario do que sucede nas espe-

cies do genero *Laelaps* Koch, em que sempre as *perimatralia* se apresentam prolongadas atrás das estigmas. Tritosterno sempre longo e com lascinias filamentosas.

As cerdas da zona descoberta da face ventral, de regra, são tanto maiores quanto mais posteriores, podendo mesmo haver um par bem maior do que os restantes no bordo posterior do corpo, como se vê em *Gigantolaelaps gilmorei* e em *Gigantolaelaps vitzthumi*. Em *Gigantolaelaps oudemansi*, porém, as cerdas são sub-iguais nessa região. Em *Gigantolaelaps comatus* as cerdas da zona ventral descoberta são mais longas do que de habito. A zona ventral da região externa ás coxas de regra é nua, mas em *Gigantolaelaps brachyspinosus* se apresenta recoberta de espinhos caracteristicos.

O escudo dorsal do idiosoma vai até perto do bordo posterior do corpo, exceto em *Gigantolaelaps oudemansi*, em que termina a certa distancia dessa extremidade; é relativamente estreito, deixando lateralmente faixa larga de tegumento descoberto. A quitinização é forte, principalmente na zona anterior dos bordos e na extremidade anterior, que representa a zona mais quitinizada do corpo, chegando a ter coloração quasi negra. Para êsse aspecto ainda concorrem as peritrematalia que se unem à zona anterior do bordo do escudo. As cerdas apresentam disposição quasi igual em todas as especies, havendo sempre tres pares na extremidade anterior, dos quais o anterior horizontal e curto e o posterior longo. Tambem é tipico o par de cerdas submedianas pequenas, encontrado sempre proximo do ultimo par de cerdas da extremidade posterior. Zonas areolares mais claras constituem a esculptura, apresentada por todas as especies e mais abundante nas zonas anterior e media do escudo. Marcas circulares simetricas e de diferentes tamanhos ocorrem no escudo do idiosoma em todas as especies. A zona descoberta da face dorsal apresenta cerdas e, em *Gigantolaelaps brachyspinosus* verdadeiros espinhos.

O epistoma é membranoso, largo na base e afilado no apice. Mandibulas fortes, alargadas, com coroa de cerdas nos *pulvilli*, e cerda unica proxima da inserção do *digitus fixus*. *Digitus mobilis* com dois dentes fortes e *digitus fixus* com tres, dos quais o medio em geral muito pequeno. *Pilus dentilis* não dilatado no *digitus fixus*. É frequente ver-se uma formação globosa transparente nos *pulvilli* e uma membrana entre as hastes da tesoura formada pelos dois dentes. *Styli* em forma de haste curta, de situação externa. *Labrum* triangular, lanceolado, estriado longitudinalmente e de bordos pilosos. *Paralabra* largos. *Malae internae* em forma de lascinias pilosas. A *rima hypopharyngis* tem sempre series de denticulos.

As patas do I e II pares são em geral alargadas, podendo, entretanto, suceder que não o sejam, como acontece em *Gigantolaelaps gilmorei*. O IV par é sempre o mais longo. As coxas podem ser apenas cerdosas ou apresentar espinhos, sendo caracteristica no genero a cerda posterior da coxa II, que é de regra excepcionalmente longa, fazendo apenas exceção em *Gigantolaelaps oude-*

mansi, em que assim mesmo tem comprimento maior do que qualquer outra cerda das coxas. Nos basi- e telo-fémures das patas I ha sempre cerdas dorsais extremamente longas, em geral em numero de duas em cada um desses articulos, existindo tambem cerda longa no basifemur II. Os tarsos do I par têm apenas pêlos finos. Os tarsos II têm cerdas longas e mais fortes do que em qualquer outro dos pares de patas. As cerdas do tarso III são mais longas do que as do tarso II, porém um pouco mais fracas. Os tarsos IV têm cerdas muito longas e finas. Em *Gigantolaelaps brachyspinosus* ha espinhos fortes e mesmo esporões no tarso II. A garras são mais fracas no tarso I.

O genero tem larga distribuição geografica na America do Sul, sendo já conhecidas especies do Perú, do Norte, Sul e Centro do Brasil, da Republica Argentina do Uruguai, e da Guiana Holandêsa.

Parecem ser parasitas exclusivos de ratos silvestres, nunca tendo sido por nós encontrados em ratos domesticos. O fato assinalado do encontro de *Gigantolaelaps goyanensis*, sp.n., parasitando *Metachirops opossum* deve ser casual. A infestação por especies deste genro é, de regra discreta, só excepcionalmente sendo encontrado numero elevado de exemplares.

E' interessante assinalar a raridade do encontro de ♂♂ e formas jovens, mesmo quando a pesquisa é minuciosa, não devendo o fato ser unicamente atribuido à circunstancia de serem os ♂♂ menores e passarem assim despercebidos.

A unica especie de que se conhece a larva é *Gigantolaelaps oudemansi*, sp.n., que é larvipara.

Descrição das novas especies

Gigantolaelaps oudemansi, sp. n.

(Figs. 1-5)

O dr. R. M. Gilmore, da Fundação Rockefeller, capturou em Anapolis, Estado de Goiás, durante estudos sobre a epidemiologia da febre amarela silvestre, varios lotes de *Laelaptidae*, entre os quais predominavam *Gigantolaelaps goyanensis*, sp.n., havendo ainda lotes de mais duas especies novas, *Gigantolaelaps gilmorei*, sp.n. e *Gigantolaelaps oudemansi*, sp.n.. Este material, remetido ao dr. H. de Beaurepaire Aragão, chefe de serviço do Instituto Oswaldo Cruz, nos foi por este enviado para estudo, pelo que lhe deixamos consignado agradecimento.

Gigantolaelaps oudemansi, sp.n. é, entre todas as suas congeneres a mais caracteristica, distinguindo-se pelo fato, unico no genero, de apresentar no bordo anterior da esternal das ♀♀, entre os dois longos pares de cerdas anteriores peculiares ao grupo em estudo, mais tres cerdas de dimensões bem menores.

Este fato, inteiramente excepcional e inesperado, poderia à primeira vista ser considerado caráter já por si suficiente para o estabelecimento de um novo genero, si não fosse a circunstancia de serem tres cerdas de aspecto nitidamente diverso do das cerdas esternais; este caráter é demonstrativo de tratar-se de uma aquisição secundaria e recente, que não pode ter o mesmo valor que apresentaria si se tratasse de cerdas do mesmo tipo das seis esternais habituais no grupo, caso este em que o seu caráter primario ficaria demonstrado e exigiria a criação de um grupamento distinto.

O aspecto geral e os caracteres genericos restantes, concordes com os de *Gigantolaelaps*, são, além disso, razão suficiente para, em nosso juizo, conservar neste genero a especie em estudo.

E' um acariano dotado de movimentos rapidos e capaz de viver fóra do hospedeiro, em tubos de ensaio, pelo menos 48 horas.

Descrição da ♀

Idiosoma

O idiosoma do holotipo ♀, um pouco achatado pela compressão da montagem, mede 1486 μ de comprimento por 1105 μ de largura ao nivel do IV par de patas. E', portanto, especie relativamente pequena para o genero e um tanto larga, aspecto este ultimo, sem duvida, em parte atribuivel à compressão, não devendo talvez a sua largura ultrapassar, em exemplares bem conservados, 1050 μ. A quitinização é relativamente fraca para o genero.

Face ventral (Fig. 1).

Placa esternal quadrilatera, com prolongamentos angulares pronunciados, de superficie reticulada e muito finamente pontilhada. O espessamento dos bordos, tão frequente em outras especies do genero, não existe nos bordos anterior e posterior, sendo pouco pronunciado nos laterais. Anteriormente, ao nivel dos angulos anteriores, sua largura é de 292 μ, sendo de 370 μ ao nivel dos angulos posteriores. O comprimento na linha mediana é de 235 μ apenas, incluida a saliencia anterior. É muito caracteristica nas especies sul-americanas do genero a projeção anterior da placa esternal, saliencia esta em cujos bordos laterais ficam implantadas as cerdas do par anterior.

Na especie que estamos descrevendo esta saliencia tem 27 μ de comprimento por uma largura de 148 μ, continuando-se a ela imediatamente uma preesternal. Os bordos laterais são concavos e um tanto espessados e o posterior ligeiramente deprimido no centro. As cerdas habituais da esternal têm o aspecto peculiar ao genero: muito largas e longas; o par anterior mede 228 μ de com-

primento, por uma maior largura, perto da base, de 15 µ ; este par, como os restantes das zonas quitinizadas ventrais, nasce com largura menor do que a maxima, estreitando-se em seguida gradualmente para terminar em ponta afilada e implantando-se nos extremos do prolongamento anterior já referido da esternal. O par medio tem 235 µ de comprimento, implantando-se um pouco para dentro dos bordos laterais, mais proximo do bordo anterior do que do posterior. O par posterior mede 260 µ, ficando implantado um pouco para dentro e para trás dos angulos posteriores.

Como já ficou acentuado, apresenta esta especie, além das seis cerdas esternais habituais, ainda uma serie de tres cerdas de dimensões menores, com 95 µ de comprimento; a impar está implantada na linha mediana, no mesmo nivel que o par normal anterior, portanto, já na saliencia do bordo anterior da placa; as pares ficam mais ou menos equidistantes da mediana e das laterais anteriores, num nivel mais posterior, que equivaleria ao nivel do bordo anteror da placa, si não existisse prolongamento anterior; o intervalo entre as cerdas pares pequenas é de 50 µ e o existente entre as antero-laterais é de 102 µ. Em alguns exemplares do lote 1168, todavia a cerda mediana secundaria se desdobra em duas, colocadas lado a lado na linha media ou uma atrás da outra.

Pre-esternal continuando-se imediatamente à esternal, parecendo mesmo que o prolongamento anterior desta cavalga o seu bordo posterior, muito mais fracamente quitinizada, prolongando-se até o ponto de origem do tritosterno, de superficie reticulada.

Metaesternais longas e estreitas, indo desde o bordo posterior da esternal até quasi o meio da coxa IV; apresentam, no mesmo nivel do intervalo entre as coxas III e IV, uma longa cerda, em tudo semelhante às da esternal, medindo 255 µ de comprimento.

Tritosterno largo e longo, filamentoso desde o ponto de bifurcação, atingindo os *cornicula maxillaris*.

Genital — Esta placa é, nas especies sul-americanas do genero *Macrolaelaps*, sempre curta e pouco dilatada posteriormente, culminando este ultimo carater na especie em causa, na qual quasi não se percebe dilatação, medindo a placa 133 µ de largura imediatamente adiante das cerdas genitais, seu ponto mais estreitado, e 144 µ ao nivel do ponto mais dilatado da zona posterior. As cerdas genitais têm aspeto identico ao das esternais e medem 182 µ. Além de uma mancha mais clara em forma de forquilha, não se percebe outro desenho na placa, que apresenta pontuação finissima. O comprimento da placa até o *epigynum* inclusive é de *ca* 400 µ.

Anal — Fica a 373 µ da genital e mede cerca de 155 µ de comprimento (dificil de medir por acompanhar a placa a curvatura da extremidade posterior do corpo) por 180 µ e distando 30 µ de maior largura, medindo o anus 60 µ

do bordo anterior. A superficie da placa é reticulada, tendo os angulos laterais mais quitinizados, como é frequente no genero. A zona do *cribrum* não atinge o nivel do anus. As cerdas pares medem 160 μ, ficam equidistantes do meio do anus e do seu polo posterior, muito mais proximas da margem do orificio anal do que do bordo da placa. A cerda posterior mede 240 μ, sendo um pouco mais larga e mais flexivel do que as pares.

Inguinais — Pequenas, com cerca de 60 μ de comprimento, e estreitas, medindo cerca de 22 μ de largura.

Estigmas ao nivel do intervalo entre as coxas III e IV. Tubos do peritrema visiveis até a coxa II, caminhando pela face ventral e pelo bordo. *Peritrematalia* muito pouco desenvolvidas posteriormente e pouco quitinizadas, visiveis até a coxa I. Na face ventral descoberta ha cerca de cinco pares de cerdas entre a genital e a anal e uma centena de cerdas esparsas pelo resto desta superficie, excetuanda a zona antero-lateral, que é nua.

Face dorsal (Fig. 3).

E' parcialmente recoberta pelo escudo dorsal, constituido por placa relativamente estreita, curta e de quitinização fraca, salvo na zona marginal anterior até a altura da margem posterior do 1.º par de coxas, onde é mais forte a quitinização. A superficie do estudo apresenta reticulo mais estreito do que o mostrado na Fig. 2, só apresentando escultura, representada por areas finamente pontilhadas, na zona media. O escudo dorsal mede 1288 μ de comprimento por 735 μ ao nivel das coxas IV, onde apresenta largura maxima. A sua extremidade anterior muito aguda e projetada para diante, como é regra nas especies sul-americanas do genero, apresenta tres pares de cerdas: o primeiro dirigido horizontalmente para diante, mede 68 μ; o segundo, vertical e, porisso, dificil de medir, tem cerca de 110 μ; o terceiro, mais largo e mais flexivel, dirige-se para trás e mede 220 μ. Há, além desses, 11 pares de cerdas submedianas, dos quais o quarto é o mais afastado da linha media e o nono o mais aproximado, decrescendo o seu comprimento do primeiro ao nono par (1.º par = 182 μ; 2.º par = 159 μ; 3.º até 5.º pares = 144 μ; 6.º par = 136 μ 7.º e 8.º pares = 128 μ; 9.º = 113 μ e 10.º 60 μ apenas); o 11.º par ou postero-mediano do escudo, volta a ser longo, medindo 166 μ. Existem, além destas, cerca de 15 cerdas marginais de cada lado e cerca de 10 de cada lado entre estas e as sub-marginais. Todas as cerdas são lisas nesta especie, tanto na face dorsal, quanto na ventral ou nos membros, não existindo, portanto, farpas como é frequente no genero *Laelaps*. O escudo dorsal apresenta, além do par de poros anteriores habitual, situado na projeção anterior do escudo, alguns pares de fendas pequenas e algumas marcas circulares.

Gnatosoma

Palpos — Com 320 μ do 1.º ao 5.º articulos. O 1.º articulo tem apenas duas cerdas centrais relativamente longas. O 4.º articulo apresenta a cerda bifida, apicilar e interna caracteristica dos *Laelaptidae*. A formula dos articulos é 1,2 (3,4),5.

Maxillicoxae bombeadas externamente, com cerdas de 95 μ. Cerdas anteriores do hipostoma com 75 μ; postero-externas com 80 μ e postero-internas muito longas, com 138 μ.

Corniculi bem quitinizados.

Rima hypopharyngis com varias series de 2 a 3 denticulos.

Epistoma membranoso de margens rugosas, prolongando-se em ponta na frente.

Labrum triangular, longo, atingindo a extremidade distal do 2.º articulo dos palpos, afilado gradualmente, terminando em ponta, piloso nos bordos.

Paralabra largos, rombos, membranosos.

Malae internae membranosas, filamentosas, flexiveis, pilosas.

Styli em forma de haste com ligeira concavidade interna, pouco quitinizados, não atingindo o apice dos *corniculi*.

Mandibulas possantes (Fig. 2), medindo 304 μ da extremidade proximal do genual até o apice, com largura de 70 μ no genual. *Pulvillus* com coroa de cerdas. Pêlo na base do *digitus fixus*. *Digitus mobilis* com 102 μ, apresentando dois dentes iguais. *Digitus fixus* com tres dentes de situação mais anterior do que a dos do *digitus mobilis*, dos quais o posterior é o maior e o medio o menor, e com um *pilus dentilis* de 15 μ de comprimento.

Patas — Robustas e cerdosas, apenas apresentam um espinho, o posterior da coxa III. Das patas o IV par é o mais longo, medindo cerca de 1350 μ e o II par o mais curto, com 920 μ apenas, sendo de 105 μ o comprimento do I e do III pares. A coxa I apresenta duas cerdas, a distal maior, com 120 μ e mais fina e a proximal com 95 μ. Basifémur I largo, com 138 μ de maior largura, com duas cerdas longas distais e dorsais, medindo a maior, que é a mais distal, 280 μ e a menor 115 μ. Telofémur I alargado, com 150 μ de maior largura, com quatro cerdas longas, das quais a maior, que é a mais proximal, mede 266 μ e a menor, a mais distal mede 115 μ; apresenta além dessas outras cerdas curtas. O tarso tem cerdas finas e curtas, relativamente ás homologas das outras patas, e uma area apicilar coberta de pelos curtos. *Pulvillus* bem desenvolvido e garras fracas relativamente às das outras patas.

Pata II muito alargada, medindo o telofemur 190 μ de maior largura. Coxa II com duas cerdas, das quais a anterior, menor, é curva. A posterior

mede 175 μ, fazendo, portanto, exceção, pois em todas as especies sul-americanas do genero costuma ser muito mais longa, exceto nesta e em *Macrolaelaps brachyspinosus* Foxs.. Os restantes segmentos apresentam-se cerdosos, porém, sem espinhos, terminando o tarso com *pulvillus* e duas garras fortes e encurvadas em angulo reto.

Coxa II com uma cerda encurvada anterior e um espinho posterior, o unico merecedor desse nome na especie que descrevemos, medindo este 60 μ de comprimento por 12 μ de largura na base. Articulos restantes da pata III cerdosos, principalmente o tarso onde ha cerdas espiniformes mais fortes do que nas outras patas, garras fortes, encurvadas em angulo reto.

Coxa IV com cerda mediana, curta e fraca. Outros articulos com cerdas finas e longas.

Larva

(Figs. 4-5)

A larva foi obtida do lote 1168, capturado pelo autor, que a poude obter conservando as numerosas ♀♀ colhidas (não foram encontrados ♂♂ neste como em outros lotes) em tubo de ensaio. Ao cabo de algumas horas haviam já nascido varias larvas, que, observadas durante cerca de 24 horas, não tinham ainda feito muda, tendo sido então montadas para a competente descrição.

Larvas de grandes dimensões, medindo o idiosoma 995 por 645 μ de largura, no nivel do 3.º par de patas. Até o apice dos palpos mede a larva 1380 μ

Face ventral (Fig. 4) — A fraca quitinização da larva não deixa ainda perceber a existencia de placas, nem mesmo da anal. No propodosoma vêem-se dois pares de cerdas com cerca de 120 μ de comprimento, o anterior na altura do intervalo entre as coxas I e II com cerdas mais aproximadas e o posterior ao nivel do bordo posterior da coxa II com cerdas mais afastadas da linha media, distanciados 150 μ um do outro. Estes dois pares parecem corresponder ao par anterior e ao posterior da placa esternal do adulto, não sendo vistos vestigios do par medio, nem das cerdas medianas secundarias do bordo anterior da esternal. Um outro par de cerdas de dimensões semelhantes existe na altura da coxa III, correspondendo ao par metaesternal. Na região que, no adulto, corresponde ao par de cerdas genital, vê-se na larva o menor dos pares de cerdas da face ventral, o qual mede apenas 46 μ, distando 75 μ uma cerda da outra, cerdas, mais longas, com 90 μ, situadas a igual distancia uma da outra. Ainda sendo, portanto, bastante aproximadas. Logo atrás deste par ha duas outras um pouco para trás e para fóra ha outro par de cerdas, com 106 μ de comprimento. Mais para fora e para trás ha ainda dois outros pares de cerdas um pouco maiores. Na extremidade posterior, finalmente, ha dois pares de cerdas

extremamente longos: um submediano, com 405 μ e outro com igual comprimento, um pouco mais para fóra.

O anus é ladeado por tres cerdas: duas pares, laterais, muito longas, com 230 μ de comprimento, e uma impar, posterior, com 290 μ. Não ha vestigios da quitinização da zona anal.

Os estigmas parecem representados por zonas refringentes marginais, situadas bem para trás do terceiro par de patas. Não foi visto peritrema.

Face dorsal (Fig. 5) — Não foram vistas zonas de maior quitinização na face dorsal nos dois exemplares examinados. A zona anterior da face dorsal apresenta, além do par de cerdas verticais, cinco outros pares na zona media, dos quais o primeiro e o terceiro são os mais aproximados e o quarto o mais afastado da linha mediana; ha, além desses, quatro pares de cerdas sub-marginais. Na extremidade posterior do opistosoma ha quatro pares de cerdas longas, das quais as maiores com cerca de 380 μ.

Patas — Dos tres pares o segundo é o mais curto. As coxas apresentam todas duas cerdas, sendo já a maior a cerda posterior da coxa II.

Gnatosoma

Epistoma em forma de faixa transversal mais larga no centro, com extremidades ponteagudas, de bordo livre liso. *Mandibula* com dedos fixo e movel, parecendo cada um apresentar um pequeno dente, não tendo sido vistas cerdas na base dos dedos. *Labrum* lanceolado e finamente piloso. *Maxillicoxae* com as *setae maxillicoxales* fraturadas, apenas tendo uma das *anteriores* e uma das *posteriores*. *Rima hypopharyngis* com bordos ligeiramente serrilhados. *Tritosterno* com pêlos finos já desde proximo da bifurcação. Palpos com pêlos numerosos no 5.º articulo e cerda bifida no 4.º:

Holotipo ♀ No. 1013 da nossa coleção no Instituto Butantan, capturado, juntamente com os numerosos exemplares ♀ ♀ do lote No. 914, sobre rato silvestre de especie não determinada, por R. M. Gilmore, a 7-X-936, em Anapolis, Estado de Goiás. Metatipos e topotipos capturados pelo mesmo colecionador nos lotes No. 910, parasitando "*Sylvagus* ♂" (*sic*); No. 912 e 915 sobre rato não determinado; No. 970, sobre *Echimys*, sp. juntamente com *Gigantolaelaps gilmorei*, sp. n., ♂ e ninfas desconhecidas.

Metatipos e larvas do lote 1168 capturados pelo autor sobre a ratazana silvestre *Nectomys squamipes* BRANTS, No. 1521 do registo da Secção de Parasitologia do Instituto Butantan, nas matas da Serra da Cantareira, em São Paulo, a 23-IX-37.

O nome da especie é dedicado ao notavel acareologista A. C. Oudemans, a quem tanto deve esta divisão da zoologia, o qual dá neste momento publi-

cidade a um exaustivo e erudito trabalho critico de revisão do grupo, destinado a tornar-se classico.

Gigantolaelaps gilmorei, sp.n.

(Figs. 6-10)

Pertence esta especie ao numero das que foram capturadas por R. M. Gilmore, em Anapolis, Estado de Goiás, durante estudos sobre febre amarela silvestre realizados em roedores selvagens. Dela possuimos dois lotes: o lote tipo, de No. 913, da coleção do Instituto Butantan, capturado sobre "ratos", No. 1527 de Gilmore, cujo hospedeiro se achava tambem parasitado por *Gigantolaelaps oudemansi*, sp. n., e o de No. 951, capturado sobre *Echimys*, sp., No. 1036 de Gilmore. E' uma das maiores especies do genero, diferindo das especies restantes pelo menor alargamento dos femures da pata I. A quitinização é media.

Descrição da ♀

(Figs. 6-8)

Idiosoma

Especie muito grande, cujo idiosoma mede 2024 µ, de comprimento no holotipo, sendo de 2630 µ o comprimento até o apice dos palpos. A largura ao nivel do IV par de coxas é de 1320 µ. A forma geral é mais eliptica do que ovoide, embora a extremidade anterior seja mais afilada.

Face ventral (Fig. 6).

Placa esternal de superficie reticulada e pontilhada, com prolongamentos angulares pouco pronunciados atrás; mede no bordo anterior 430 µ de largura e no posterior 570 µ. O comprimento na linha media é de 300 µ, incluida a projeção mediana. Esta projeção não é muito pronunciada, medindo apenas 38 µ por 250 µ de largura, sendo de quitinização igual à da placa, nitidamente diferenciada, portanto, da pré-esternal, que a ela se segue imediatamente. Dos bordos apenas nos laterais, que são concavos, se percebe um ligeiro espessamento. O bordo posterior é levemente concavo na parte central, sendo margeado por zona menos quitinizada, que tambem existe em volta dos bordos laterais, onde é denteada.

As cerdas anteriores da placa atingem o bordo posterior, medindo 236 µ por 19 µ de maior largura a alguma distancia da base; ficam plantadas ao nivel

do angulo externo da projeção anterior da placa e distam 174 µ uma da outra. Par medio mais proximo do angulo anterior do que do posterior da placa, implantado um pouco para dentro do bordo lateral, medindo 334 µ indo até além do meio da coxa III. Cerdas posteriores afastadas do angulo posterior, medindo 350 µ, muito afiladas para a extremidade distal como todas as cerdas longas desta especie, quasi atingindo o meio da coxa IV. Poros anteriores transversais, grandes, situados atrás das cerdas anteriores; poros posteriores obliquos, para trás e para dentro das cerdas medias.

Pre-esternal de quitinização fraca, originando-se imediatamente para frente da esternal e indo até a base do tritosterno, com superficie estriada.

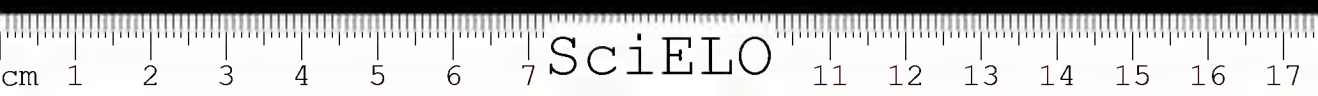
Metaesternais alongadas, acompanhando o bordo interno das coxas III e IV e medindo 342 µ.

Tritosterno largo na base onde mede 60 µ de largura, com pilosidade desde pouco depois da origem das *lasciniae*, mede da base ao apice 470 µ atingindo a base dos *cornicula*.

Genito-ventral — Placa de quitinização mais fraca do que a esternal, alongada e muito pouco dilatada posteriormente, não ultrapassando a maior largura da porção ventral a da porção genital, isto é, atingindo no maximo 220 µ de largura. O comprimento é de cerca de 644 µ; a maior largura é de 166 µ logo atrás do par de cerdas genitais. A superficie é pontilhada e apresenta reticulo pouco nitido. As cerdas genitais semelhantes às esternais, medem 288 µ A escultura da genito-ventral é representada por duas series de manchas claras divergentes e que se originam na região submediana, logo para trás das cerdas genitais, dirigindo-se para trás e para fóra.

Anal — Fica a 380 µ do bordo posterior da genito-ventral no holotipo, atingindo 760 µ em exemplar gravido. O comprimento é dificil de medir devido à curvatura da extremidade posterior do opistosoma que a placa acompanha, devendo ter cerca de 266 µ de comprimento. A largura maxima é de 258 µ no bordo anterior do holotipo, medindo 288 µ em outro exemplar. O anus fica a cerca de 38 µ do bordo anterior. A forma da placa é triangular e a superficie reticulada, com bordos externos e angulos mais escuros. O bordo anterior é levemente concavo no centro. As cerdas pares ficam mais ou menos ao nivel do polo posterior do anus, medindo cerca de 212 µ; a cerda par mede de 380 µ, atingindo o *cribrum* mais ou menos o seu ponto de emergencia.

Inguinais alongadas, com cerca de 76 µ.

Estigmas situados ao nivel do intervalo entre as coxas III e IV. Peritremas visiveis em larga extensão, acompanhadas de *peritrematalia* muito desenvolvidos anteriormente, terminando posteriormente esta placa ao nivel dos estigmas, não tendo sido visto o prolongamento posterior. Zona ventral descoberta

com numerosas cerdas longas e finas, que raream nas partes laterais e proximo da anal.

Face dorsal (Fig. 7).

Escudo dorsal cobrindo quasi inteiramente o idiosoma e deixando apenas livre uma faixa que margea os bordos laterais e posterior. Mede 1940 μ de comprimento por 1160 μ de maior largura. Sua extremidade anterior termina em ponta, sendo a posterior larga e convexa. Os bordos laterais são ondeados anteriormente, sendo paralelos e retos na zona media. A impressão da forte quitinização da porção anterior dos bordos laterais é, em grande parte, dada pela forte quitinização das *peritrematalia*, vistas por transparencia. A superficie do escudo apresenta reticulo fino e escultura muito extensa, indo desde a extremidade anterior até o limite posterior, mas sendo mais pronunciado na metade anterior. A zona ponteaguda anterior do escudo apresenta os 3 pares de cerdas habituais: um anterior projetado para frente, um vertical, mais curto, e um mais longo dirigido para trás. As cerdas anteriores restantes do escudo medem cerca de 185 a 220 μ e as da zona posterior cerca de 150 μ, excetuando o par submediano proximo da extremidade posterior, que mede 88 μ, e o posterior terminal, que tem cerca de 200 μ de comprimento. Além do grupo de 3 pares anteriores ha 11 pares submedianos, dos quais os 5.º, 6.º e 10.º são os mais proximos e os 4.º e 8.º os mais afastados da linha mediana. Varios pares de marcas circulares são ainda vistas na superficie do escudo, bem como um par de poros anteriores, em forma de fenda. A superficie lateral descoberta da face dorsal apresenta cerdas numerosas. Todas as cerdas são lisas nesta especie.

Patas

No exame das patas chama a atenção o fato de não se apresentarem os femures da pata I tão dilatados quanto em outras especies do genero, não havendo tambem tuberosidades neste segmento. Outro caráter da especie é não serem as patas II tão alargadas quanto seria de esperar dado o seu tamanho. O espinho da coxa III é o unico que existe.

Pata I é a 2.ª em comprimento. A coxa I tem duas cerdas, a distal mais fina, com 220 μ e a proximal com 170 μ. O telofemur I mede só 170 μ de largura e apresenta duas cerdas das quais uma com cerca de 170 μ apenas e outra com cerca de 230 μ, além de outras curtas, não tendo tuberosidade. O basifemur tem uma cerda longa com 258 μ, aproximadamente, tambem não apresentando tuberosidade. Tarso com cerdas finas.

Pata II pouco alargada, medindo o basifemur 220 μ de largura. Coxa II com duas cerdas das quais a posterior, cujo comprimento é tão caracteristico no genero *Gigantolaelaps*, mede 236 μ. O tarso tem cerdas espiniformes longas,

mais fortes que as das outras patas, terminando em *pulvilli* e garras iguais às das patas III e IV e mais fortes que as da pata I.

Pata III apresentando espinho posterior na coxa, com cerca de 100 µ de comprimento por cerca de 22 µ de maior largura na base.

Pata IV é a mais longa, tendo a coxa apenas uma cerda, sendo notavel o comprimento das cerdas inseridas no tarso, que podem atingir 260 µ .

Gnatosoma

O gnatosoma mede 800 µ da base ao apice dos palpos, só tendo podido ser examinado minuciosamente após disseção de um exemplar do lote 951.

Palpos com 530 µ, tendo o 1.º articulo uma cerda ventral de quasi 150 O 5.º articulo é longo, medindo 80 µ.

Maxillicoxae com todas as cerdas de grande desenvolvimento, medindo, respectivamente, 142, 224, 142 e 135 µ.

Corniculi maxillaris bem chitinizados, com ponta aguda.

Labrum piloso, gradualmente afilado para a extremidade distal, terminando em ponta não muito fina, recoberta por formação de igual aspecto e conformação.

Malae internae maxillarum pilosas, retas, contiguas, medianas, terminando em ponta afilada e sem pêlos.

Styli membranosos, ligeiramente encurvados, de aspecto canaliculado, atingindo o apice dos *corniculi*.

Mandibulas (Fig. 8) fortes, com dois dentes (o posterior maior) no *digitus mobilis* e tres no *digitus fixus* (o medio menor e o posterior maior), que apresenta um *pilus dentilis* não dilatado; na base do *digitus fixus* um pêlo curto e na do *digitus mobilis* coroa de cerdas com formação globosa, transparente no meio. Na superficie interna do *digitus fixus* vê-se tambem uma formação lamelar, de aspecto membranoso.

Descrição do macho

(Figs. 9-10)

Entre o material capturado por Gilmore recebemos um lote, o de N. 1068, colhido sobre *Echimys*, sp., em Anapolis, Estado de Goiás, que constava de **duas** especies: *G. oudemansi*, sp.n. e *G. gilmorei*, sp.n.. No material predominavam as ♀♀, existentes em grande numero, não havendo formas jovens; foi, porém, encontrado tambem um exemplar macho. Não é facil decidir si o ♂ encontrado pertence a especie *G. oudemansi*, sp.n. ou a *G. gilmorei*, sp.n..

Inclinamo-nos, todavia, a aceitar de preferencia a segunda hipotese, não só porque se trata de exemplar de grandes dimensões, maior do que as ♀♀ de *G. oudemansi*, como tambem devido à inexistencia das tres cerdas pequenas do bordo anterior da esternal, caracteristicas desta especie. Este ultimo carater não deve, todavia, ser considerado decisivo, pois não se pode *a priori* excluir a hipotese da inexistencia de tres cerdas em *G. oudemansi* ♂♂, mesmo porque é justamente nessa zona que se encontra o orgão sexual masculino, fato que por si só justificaria tal dimorphismo sexual. As grandes dimensões do exemplar e algumas outras minucias de morfologia, tais como a escultura do escudo do idiosoma e o não alargamento e a inexistencia de tuberculos nos femures I. falam ainda a favor da identidade com *Gigantolaelaps gilmorei*, especie a que filiamos, provisoriamente, o ♂ encontrado.

Idiosoma

Exemplar alotipo de contorno quasi eliptico, apenas mais afilado na extremidade anterior, de espaduas pouco pronunciadas. Idiosoma com quitinização fraca, de grandes dimensões, medindo 1760 μ de comprimento por 1175 μ de maior largura ao nivel do IV par de patas.

Face ventral (Fig. 9).

Tritosterno largo na base, com 340 μ de comprimento e *laciniae* pouco pilosas.

Placas ventrais fundidas, pouco quitinizadas, com reticulo em toda extensão, de malhas mais estreitas na zona ventral. Bordo anterior da esternal pouco proeminente, nele se abrindo a genitalia e continuando-se com uma pre-esternal mais fracamente quitinizada que vai até o tritosterno. Angulos antero-externos proeminentes, formando prolongamentos entre as coxas I e II. Angulos posteriores da esternal pouco salientes. Bordos laterais da esternal espessados, bem como os da zona meta-esternal. Zona ventral muito alargada, apresentando seus bordos varias chanfraduras. Cerdas esternais anteriores com 175 μ, cerdas medias e posteriores um pouco mais fortes e com 208 μ. Cerdas metaesternais com 152 μ e genitais com 148 μ. A superficie da zona ventral é recoberta por cerca de 150 cerdas finas de 90 a 110 μ de comprimento. A placa anal é diferenciavel pelo reticulo mais largo, tendo forma semelhante à da ♀. As cerdas pares desta placa medem 140 μ e a impar 245 μ. As placas inguinais ficam incluidas na placa ventral, que é extremamente larga na frente, estreitando-se gradualmente para trás, aparecendo as inguinais sob a forma de zonas mais claras de contorno um pouco irregular.

Estigmas ao nivel do intervalo entre as coxas III e IV.

Peritrema de tubo curto, terminando ao nivel do bordo posterior da coxa II.

Peritrematalia prolongam-se anteriormente até a extremidade anterior do idiosoma, mais largas entre as coxas II e III e fortemente quitinizadas anteriormente. Posteriormente ao estigma parecem ser interrompidas em certa extensão, reaparecendo depois para contornar a coxa IV até a face ventral, aspecto este que tambem parecem apresentar as ♀ ♀ nas especies deste genero.

Face dorsal (Fig. 10).

Escudo do idiosoma relativamente pouco quitinizado, de bordos regulares, curvatura pouco pronunciada ao nivel do ombro, extremidade posterior larga e regularmente arredondada e anterior bem afilada. As margens mais quitinizadas até o nivel da coxa II devido a aparecerem por transparencia as *peritrematalia*. A extremidade anterior do escudo tem um par de cerdas anteriores com 120 μ, um par medio com cerca de 70 μ apenas e um posterior com 200 μ. Ha, além dessas, 12 pares de cerdas da linha media, sendo o 7.º o mais afastado, o 2.º o longo, medindo 215 μ e o 11.º o mais curto, com 68 μ. O par posterior mede 195 μ. A superficie do escudo é reticulada, apresenta muitas marcas circulares, simetricas, de tamanho variavel e escultura muito semelhante à da ♀.

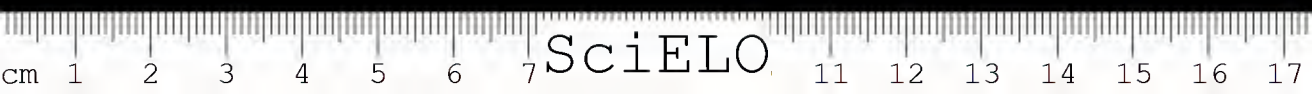
Patas

A pata IV é a mais longa, medindo cerca de 1760 μ, e a II a mais curta, com cerca de 1350 μ Coxas sem espinhos, apenas apresentando cerdas; destas a posterior da coxa II é a mais longa e mede 160 μ; é, portanto, bem menor do que o tamanho habitual nas ♀ ♀ das especies sul-americanas; a cerda da coxa IV apresenta de notavel, além de suas pequenas dimensões (pois mede apenas 60 μ), o fato de ser de implantação bem mais anterior do que é regra em *Laelaptidae*.

Os femures da pata I não são alargados e não apresentam tuberosidades, concordando com o que se passa nas ♀ ♀; o basifemur apresenta duas e o telofemur uma, cerda mais longa, respectivamente com cerca de 135 e 150 μ, sendo portanto, bem menores do que as da ♀. Tibia e tarso da pata I com pêlos finos.

Basifemur II com dois espinhos muito forte e curtos do lado ventral; telofemur II com um espinho mais fraco que as do basifemur; genual com um espinho; pretarso com dois espinhos muito fortes.

Os outros dois membros apenas apresentam cerdas, que são maiores e mais finas no tarso IV.

Todas as patas apresentam nos varios articulos escultura dorsal de manchas claras.

A especie é dedicada a R. M. Gilmore, da Fundação Rockefeller, que em Anapolis. Goiás, capturou abundante material de acarianos de ratos, o qual veiu em parte constituir objeto do presente trabalho. Depositado sob o No. 1033. na coleção do Instituto Butantan.

Gnatosoma

Mede 735 μ da base das *maxilicoxae* ao apice dos palpos.

Palpos finos; o articulo IV é o mais cerdoso; existe uma cerda ventral longa e forte no articulo I.

Maxillicoxae com as cerdas habituais, sendo as anteriores as mais longas.

Corniculi muito fracamente quitinizados e extraordinariamente alongados.

Rima hypopharyngis com cerca de 7 fileiras de pequenos denticulos.

Epistoma membranoso, largo na base e afilado no apice.

Labrum triangular, longo, gradualmente afilado, estriado longitudinalmente com pêlos curtissimos, quasi atingindo o apice do 2.º articulo dos palpos.

Malae internae longas, estriadas longitudinalmente.

Mandibulas finas, longas, atingindo o apice do 2.º articulo dos palpos quando retraidas. *Digitus fixus* muito longo, com 480 μ; termina em ponta romba, convergente, fortemente quitinizado e parece apresentar um orificio apicilar. Proximo da sua base, tem inserção uma formação membranosa alongada, afilada para a extremidade. Descrição mais minuciosa não foi possivel, dado o retraímento das mandibulas e o fato de ter sido feito o estudo com o exemplar integro.

Gigantolaelaps vitzthumi, sp. n.

(Figs. 11-14)

É a especie tipo do genero.

Especie notavel por suas extraordinarias dimensões, que ultrapassam mesmo as de *Gigantolaelaps gilmorei*, sp. n., atingindo 2580 μ de comprimento até o apice dos palpos; é, portanto, no grupo, o maior parasita conhecido.

Mais ainda do que por suas dimensões, das quais se aproximam algumas outras especies, fica o especialista surpreendido pela coloração carregada, castanha escura, vista em preparados clareados pelo liquido de Berlese, como pontos negros nas zonas de mais intensa quitinização; à vista desarmada a coloração é ainda mais carregada, principalmente no propodosoma, devido à existencia da quitinização esternal.

Desta especie, capturada pelo sr. Blaser nos limites de Minas Gerais e Goiás, apenas possuimos ♀♀, não sendo o ♂ e os jovens desconhecidos.

Idiosoma

Muito grande, com 2050 μ de comprimento, muito largo na frente, estreitando-se para trás, com largura maxima de 1560 μ ao nivel do IV par de patas. O alargamento brusco na frente não determina a constituição de ombros pronunciados.

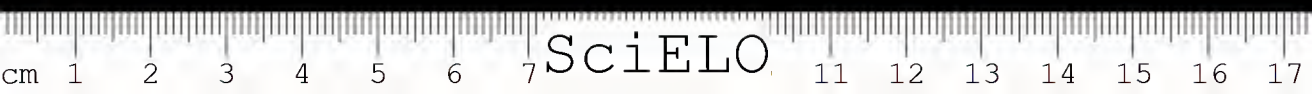
Face ventral (Fig. 11).

Placa esternal — Muito fortemente quitinizada, tal como sucede a *Laelaps sculpturatus* Vitzthum, segundo a modelar descrição deste notavel acareologista, de superficie reticulada, com projeção anterior tão pronunciada que avança até a base do tritosterno, numa extensão de 118 μ; da quitinização fraca da pre-esternal apenas se vê uma faixa estreita e elevada circundando esta projeção. Que esta projeção faz parte integrante da esternal, não representando o resultado da quitinização e fusão da pre-esternal com a esternal, parece-nos certo, porquanto é nela que se vai implantar o par de cerdas esternais anteriores, ficando o par anterior dos *pori repugnatorii* exatamente no limite da sua base. Dos bordos da esternal os laterais e o posterior, mas principalmente este, são espessados, apresentando este espessamento no bordo posterior a largura de 55 μ. Os angulos anteriores apresentam longas projeções entre as coxas I e II, sendo as posteriores muito menos pronunciadas. As cerdas esternais são muito longas, fortes e pouco flexiveis, medindo o par anterior 347 μ, o medio 408 e o posterior 370 μ. A placa, de comprimento de 382 μ, mede de largura 205 μ ao nivel do prolongamento anterior, 382 μ imediatamente para trás deste e 558 μ ao nivel dos angulos posteriores.

Metaesternais alongadas, menos quitinizadas, elevadas, com cerda de 347 μ de comprimento ao nivel do intervalo entre as coxas III e IV.

Tritosterno com 355 μ de comprimento, bifido, com lascinias pilosas desde o ponto de emergencia.

Genito-ventral pouco expandida posteriormente, medindo de comprimento 642 μ, com maior largura, posteriormente, de 294 μ e menor, logo para trás das cerdas genitais, de 235 μ. A superficie apresenta reticulo largo e alguma escultura na zona genital; o par de cerdas genitais mede 296 μ de comprimento. Como nas restantes especies sul-americanas do genero, não ha cerdas inseridas no rebordo ventral desta placa, notando-se, porém, o que tambem ocorre em outras especies, que este rebordo é deprimido pelas cerdas da zona ventral descoberta que se acham inseridas mais perto da placa; no caso vertente ha 5 cerdas que depri-

mem o bordo nessa região, ficando uma das do par mediano suficientemente afastada para não deixar impressão na placa.

Anal a 460 μ de distancia do bordo posterior da genito-ventral, de forma triangular com angulos arredondados, com anus de 83 μ de comprimento, a 53 μ do bordo anterior. Bordo anterior da placa levemente concavo e laterais ligeiramente convexos; superficie reticulada. Cerdas pares ao nivel do meio do anus com 244 μ num cotipo e 290 μ em um paratipo; a cerda impar, fraturada nos cotipos, media no mesmo paratipo 355 μ de comprimento. O *cribrum* atinge dos lados o nivel da cerda posterior. Ha cerca de 100 cerdas esparsas pela superficie ventral descoberta da placa, com comprimento que oscila entre 150 e 225 μ.

Inguinais pequenas, alongadas, de quitinização relativamente fraca.

Estigmas ao nivel do intervalo entre as coxas III e IV.

Peritrema com tubo visivel até mais ou menos o nivel do bordo anterior da coxa II.

Peritrematalia praticamente sem quitinização posterior aos estigmas, mais largas no intervalo entre as coxas II e III e muito fortemente quitinizada da coxa II em diante, onde formam uma placa dorsal que se une à zona anterior do escudo dorsal, constituindo um dos pontos de maior quitinização do corpo.

Face dorsal (Fig 12).

Escudo do idiosoma fortemente quitinizado, não cobrindo todo o corpo; deixa larga margem lateral e posterior descoberta, mais estreitada nas extremidades, principalmente na anterior, que é aguda e proeminente, tal como nas restantes especies do genero. Mede este escudo 1910 μ de comprimento por 1264 μ de largura ao nivel do IV par de patas. Sua superficie é toda desenhada por um reticulo de malhas estreitas. A escultura é abundante na metade anterior e rara na posterior, havendo uma grande mancha clara central logo para trás do polo anterior do escudo. Os bordos são regulares e as espaduas pouco pronunciadas. Os pares de cerdas submedianas são em numero de 14 mais ou menos, incluidos os tres pares da projeção anterior estes têem o aspecto habitual: anterior, de dimensões medias, dirigido para a frente; medio, pequeno, vertical, e posterior, muito longo, com 350 μ de comprimento. Dos restantes pares submedianos o que fica logo após a cerda longa citada da extremidade anterior e o ultimo da extremidade posterior são os mais longos, medindo cerca de 280 μ; o menor é o penultimo que mede 88 μ apenas, sendo, portanto, como nas restantes especies do genero, de muito a menor cerda do escudo dorsal. Ha ainda cerca de 15 cerdas marginais de cada lado do escudo dorsal e outras tantas entre estas e as submedianas. Marcas circulares de situação simetrica são numerosas na superficie do

escudo. O par de poros anteriores é pouco visivel, parecendo ficar ao nivel do longo par de cerdas da projeção anterior do escudo.

Todas as cerdas são lisas, nesta como nas outras especies do genero.

Patas

Patas longas, medindo o 4.º par 1760 μ, quitinizadas, robustas, cerdosas, com 1.º e 2.º pares alargados.

Pata I fortemente fletida, mesmo em repouso. Coxa I larga, com serrilha de dentes aguçados nos lados anterior e posterior do bordo distal, muito maiores neste ultimo. Espinho proximal da coxa, de desenvolvimento medio, com 80 μ implantado em tuberosidade; cerda distal com 96 μ. Fémures alargados, medindo até 260 μ de largura. Maior cerda do basifémur com 470 μ, medindo a outra cerda longa do mesmo articulo 380 μ. No telofémur existem tambem duas cerdas mais longas do que as restantes, medindo a maior cerca de 380 μ. As cerdas de maior desenvolvimento se inserem em tuberculos fortemente quitinizados que dão à superficie dos articulos um aspeto eriçado. Tambem na tibia ha cerdas fortes; as do tarso, porém, são fracas, terminando-se este articulo em *pulvillus* com garras.

Pata II muito alargada e tambem fletida para o lado ventral. Coxa II com espinho dorsal extremamente largo, terminando em ponta muito aguçada, fazendo saliencia no rebordo anterior do articulo. Cerda ventral posterior da coxa II com 420 μ de comprimento. Com exceção do tarso, que apresenta 8 ou 9 espinhos fortes, o restante revestimento é constituido por cerdas medias.

Pata III não alargada. Espinho posterior da coxa com 80 μ. Espinhos do tarso mais longos e tão fortes quanto os da pata II.

Pata IV é a mais longa, só apresentando cerdas relativamente fracas e rigidas no tarso. Na coxa só ha uma cerda.

O aspeto das patas da ♀ deixa prever forte alargamento das patas do ♂, que deve apresentar espinhos fortissimos, verdadeiros esporões.

Descrição feita de dois cotipos ♀ ♀, um dos quais dissecado, montados em laminas No. 1041 da nossa coleção no Instituto Butantan; paratipo sob o No. 518 na mesma coleção. Macho e formas jovens desconhecidos.

A especie é dedicada ao grande acareologista Conde Hermann Vitzthum, autoridade a quem são devidos trabalhos numerosos e modelares sobre *Acari* e a quem é grato o autor por ensinamentos recebidos.

Gnatosoma

(Figs. 13 e 14)

O retraimento das mandibulas e a quitinização excecionalmente forte da especie exigiu, para um exame minucioso das peças do gnatosoma, previa dissecção de um exemplar, o que foi feito em material do lote tipo.

Palpos com 1.º articulo apresentando uma crista ventral, em que se implantam duas cerdas relativamente longas. 5.º articulo com grupo sub-terminal de sete pêlos e um mais longo terminal, além de outros esparsos.

Epistoma membranoso, de base larga, acuminado no apice, com alguns denticulos na região sub-apicilar dos bordos.

Mandibulas (Fig. 14) — O articulo que dá inserção aos dedos das *chelicerae* mede 300 μ por 102 μ de largura. O *digitus mobilis*, de 120 μ de comprimento, apresenta dois dentes ponteagudos separados por intervalo de 8 μ e distantes do apice respectivamente 20 a 35 μ. O *pulvillus* apresenta coroa de cerdas de cerca de 35 μ na base do articulo. O *digitus* fixus mede cerca de 90 μ e tem tres dentes, dos quais o proximal ponteagudo, o distal menor do que este e sub-apicilar; o dente situado entre estes dois é muito pouco visivel e fica ao lado do *pilus dentilis*. *Pilus dentilis* não dilatado, com 35 μ. Na base do *digitus fixus* um pêlo muito largo na base e rapidamente afilado. Percebe-se nitidamente uma formação globosa no *pulvillus* e uma outra lamelar na tesoura das mandibulas.

Labrum triangular, estriado longitudinalmente, piloso nos bordos e com espiculos na extremidade livre.

Malae internae sob a forma de duas lascinias muito pilosas, atingindo o apice do *labrum*.

Styli em forma de haste levemente, encurvada para dentro.

Paralabra membranosos, largos de extremidades largamente arredondados.

Maxillicoxae com as cerdas habituais, medindo as posteriores internas cerca de 150 μ.

Rima hypopharyngis com 12 fileiras de dois ou de tres denticulos, mais fortes do que habitualmente.

Cornicula apenas um pouco mais fortemente quitinizados.

Gigantolaelaps goyanensis, sp. n.

(Figs. 15-18)

A especie de que nos vamos agora ocupar é muito proxima de *Gigantolaelaps mattogrossensis* Fons., 1935, com ela tendo sido por nós confundida até em-

preendermos a revisão generica que ora apresentamos, quando um estudo comparado minucioso nos permitiu descobrir diferenças suficientemente constantes para distinguir com segurança as duas especies.

Baseia-se esta distinção principalmente no aspecto da cerda distal da coxa I, que em *Gigantolaelaps mattogrossensis* é mais estreita, gradualmente afilada, relativamente flexivel, terminando em ponta fina, ao passo que em *G. goyanensis* assume aspecto de espinho apenas um pouco menor e mais fraco do que o proximal do mesmo articulo, afilando-se pouco para a extremidade, que se estreita bruscamente, terminando em ponta semelhante à do espinho proximal. Outra distinção constante repousa no comprimento da placa esternal, que oscila entre 360 a 400 μ em *G. goyanensis* e entre 260 a 330 μ em *G. mattogrossensis*.

Gigantolaelaps goyanensis, sp.n., foi por nós identificada de material enviado: a) de Anapolis, Estado de Goiás, por R. M. Gilmore, de *Estrimys* (?) sp. No. 1043, de ratos 3094, 3874, 3876, 3850 e de *Metachirops opossum* 3873; b) de Angra dos Reis, Estado do Rio de Janeiro, sobre "rato paca", Lauro Travassos leg.; c) de Manguinhos, Distrito Federal, Rio de Janeiro, sobre *Nectomys squamipes*, Fabio Werneck leg.; d) do limite de Minas Gerais e Goiás, sobre rato silvestre, Blaser capt..

Êsse abundante material consta quasi exclusivamente de ♀♀, apenas tendo sido encontrado um exemplar ♂, escolhido para alotipo, no material enviado por Fabio Werneck. As formas jovens são desconhecidas.

Descrição da ♀

(Figs. 15 e 16)

Especie grande, com 2200 μ de comprimento até o apice dos palpos, bem quitinizada, de corpo mais largo ao nivel do III par, estreitando para trás, bastante pilosa, com algumas cerdas muito longas.

Idiosoma

Com 1850 μ de comprimento por 1293 μ de largura ao nivel do IV par e 1323 μ ao nivel do III par de patas, afilado para a frente desde o bordo anterior do II par; de aspecto cerdoso.

Face ventral (Fig. 15).

Placa esternal muito quitinizada, perceptivel sob a forma de mancha escura quando vista a olho nú em preparados clareados. Bordos espessados, principalmente os laterais, que são levemente concavos e o posterior, que é convexo e

forma frequentemente dois prolongamentos posteriores submedianos. Bordo anterior com forte projeção mediana, ocupando toda a zona pre-esternal; atinge o tritosterno, cuja base é mesmo em parte coberta pelo bordo anterior da projeção. Dos angulos os antero-laterais são os mais proeminentes. A superficie da placa é toda reticulada, sendo a quitinização da zona pre-esternal um pouco mais fraca. A placa mede 370 µ de largura ao nivel do bordo anterior e 430 µ ao nivel do posterior e tem o comprimento de 378 µ no holotipo, oscilando entre 360 µ e 400 µ em outros exemplares medidos; permite distinção com *Gigantolaelaps mattogrossensis,* no qual é menor, como já ficou assinalado. Das cerdas as anteriores, implantadas na zona pre-esternal da placa, medem 318 µ, as medias 370 µ e as posteriores 340 µ; são flexiveis e afilam-se gradualmente até terminar em ponta finissima, tal como nas outras especies do genero. A projeção esternal anterior mede 110 µ de comprimento por cerca de 350 µ de largura na base. Os poros tem a situação e forma habituais.

Da pre-esternal apenas ha indicação em um rebordo que circunda a projeção anterior da esternal.

Metaesternais com zona mais quitinizada ao nivel do intervalo entre as coxas III e IV e prolongamentos posteriores e anteriores, estes mais desenvolvidos, margeando os rebordos daquelas coxas. Cerdas metaesternais com aspecto identico ao das esternais, medindo 340 µ de comprimento.

Tritosterno largo na base, com lascinias pilosas desde o ponto de bifurcação, atingindo o nivel das cerdas posteriores do hipostoma.

Genito-ventral com cerca de 580 µ de comprimento até o *epigynum,* de quitinização media, pouco expandida posteriormente, medindo 260 µ de maior largura e 220 µ ao nivel das cerdas genitais. Reticulo largo na zona posterior e escultura representada por um grupo de seis manchas mais claras, tres de cada lado, contiguas, ao nivel das cerdas genitais. Cerdas genitais com 267 µ de comprimento. Ao nivel do rebordo posterior, depressões correspondentes aos tres pares de cerdas da superficie descoberta que se implantam mais proximo da placa, só um destes, porém, o mais anterior, a tocando no holotipo.

Anal separada da genito-ventral por um intervalo de 400 µ no holotipo. Triangular, de superficie reticulada, mais escura nos angulos anteriores, de bordo anterior mais ou menos reto no centro e angulos anteriores arredondados; maior largura da anal 207 µ, sendo o comprimento impossivel de medir no holotipo devido a acompanhar a placa a inclinação do bordo posterior do idiosoma. A cerda impar mede cerca de 222 µ e as pares cerca de 148 µ. O anus fica a cerca de 45 µ do bordo anterior.

Inguinais. Placas inguinais mais ou menos triangulares, medindo cerca de 90 µ, bem quitinizadas.

Estigmas ao nivel do intervalo entre as coxas III e IV.

Peritrema visivel até a coxa III, não podendo ser acompanhado daí em diante devido à forte quitinização.

Peritrematalia sem prolongamentos posteriores, fortemente quitinizadas, principalmente na frente, passando para a face dorsal ao nivel do ponto em que o idiosoma se estreita bruscamente, no intervalo entre as coxas I e II, visiveis até a extremidade anterior do escudo dorsal. Na zona descoberta da face ventral ha cerca de 180 cerdas rigidas, com 125 a 200 µ de comprimento, mais raras em torno da anal e ao lado das *peritrematalia*.

Face dorsal (Fig. 16).

Escudo do idiosoma de contorno muito regular, porém muito agudo na extremidade anterior, onde a quitinização atinge o maximo verificavel no corpo, com extremidade posterior terminada reta. Seu comprimento é de 1715 µ, apresentando a largura de 1030 µ ao nivel do IV par de coxas. Escultura abundante, contrastando sobretudo a forte quitinização anterior. As cerdas submedianas são em numero de 11 pares, além do grupo de 3 pares da extremidade anterior, o que foi verificado em um paratipo por estar fraturada a maioria das cerdas do holotipo. O par de cerdas submediano posterior do escudo mede 244 µ de comprimento e o de pequenas cerdas submedianas que ficam logo à frente deste mede 66 µ apenas. Marcas circulares são frequentes no escudo.

Patas

Patas I e II alargadas.

Pata I — Coxa com um espinho proximal forte, medindo cerca de 80 µ de comprimento por 18 µ de largura na base e um espinho distal rigido, um pouco menor e um pouco mais fino e de conformação igual à da proximal, nisto diferindo nitidamente de *Gigantolaclaps mattogrossensis*, onde o espinho distal é substituido por cerda espiniforme afilada e flexivel. Rebordo distal da coxa I com denticulos nos bordos anterior e posterior, maiores neste. Basifémur I com 2 longas cerdas, das quais a maior com cerda de 440 µ e a outra com cerca de 370 µ Telofémur tambem com 2 longas cerdas de cerca de 370 e 320 µ, respectivamente. Além destas apresentam ainda ambos os articulos muitas cerdas fortes. Tarso I com pêlos fracos.

Pata II muito alargada. Coxa com 2 cerdas, das quais a posterior longa, com 407 µ. No rebordo anterior da coxa um espinho muito largo e agudo. Basifémur e telofémur com uma cerda dorsal longa, medindo, respectivamente, 405 e 190 µ a primeira e a segunda. Tarso II com alguns espinhos fortes.

Pata III com 2 espinhos nas coxas e espinhos nos tarsos mais fracos e mais largos que os da pata II.

Pata IV com uma cerda na coxa e espinhos dos tarsos mais fracos e mais largos do que os da pata III.

Descrição feita do holotipo ♀ No. 1042 da nossa coleção no Instituto Butantan, exceto o gnatosoma que foi descrito de um paratipo dissecado para este fim.

Gnatosoma

Mede 392 µ até o apice dos *cornicula*, tendo sido necessaria dissecção de um paratipo para seu estudo minucioso.

Palpos sem particularidades dignas de nota.

Epistoma — Largo na base, estreitando-se bruscamente para o apice que termina em ponta afilada.

Mandibulas — Fortes, bem quitinizadas; articulo que dá inserção aos dedos mede 300 µ de comprimento por 85 µ de largura. *Digitus mobilis* com 145 µ de comprimento, de extremidade distal incurvada, tal como nas outras especies do genero, apresentando dois dentes distanciados das extremidades e bem afastados entre si; o dente distal fica a 22 µ e o proximal a 44 µ da extremidade anterior. O *digitus fixus* apresenta um dente maior situado em correspondencia com o intervalo entre os dois dentes do *digitus mobilis* e um menor, sub-terminal, na altura da extremidade distal do *digitus mobilis;* do dente intermediario, muito pequeno, que ocorre em outras especies do genero, apenas se consegue ver um vestigio um pouco à frente do *pilus dentilis* não dilatado, que apresenta este dedo Na base do *digitus mobilis* fica o *pulvillus* com sua coroa de cerdas habitual e a formação globosa transparente já assinalada em outras especies. Tambem entre os dois dedos existe a mesma formação lamelar encontrada com frequencia no genero, onde parece ser constante. Proximo da base do *digitus fixus* fica a a cerda curta e dilatada já verificada em outras especies.

Labrum — Triangular, longo, estriado longitudinalmente e piloso até o apice.

Paralabra — Largo, de apice arredondado.

Malae internae em forma de lascinias pilosas.

Styli em forma de hastes hialinas.

Maxillicoxae com as cerdas habituais, sendo as *posteriores internae hypostomatis* as mais longas.

Rima hypopharyngis com 12 series de um a dois denticulos

Cornicula de quitinização e forma normais.

Descrição do ♂

(Figs. 17 e 18)

O unico exemplar ♂ encontrado pertence ao lote No. 954, capturado sobre *Nectomys squamipes* no Distrito Federal pelo dr. Fabio Werneck, conservado na coleção do Instituto Butantan sob o No. 1043.

Macho bem menor e mais estreitado do que a femea, de conformação diferente, fracamente quitinizado.

Idiosoma

Com 1320 µ de comprimento por 820 µ de largura ao nivel do IV par, sendo as margens do corpo retas e paralelas desde o bordo posterior do II par até o meio do opistosoma, quando se estreita até a extremidade posterior.

Face ventral (Fig. 17).

Escudo holoventral — De quitinização fraca, mais pronunciada nas partes laterais da porção anal, com superficie reticulada. O bordo anterior da esternal não apresenta a projeção que têm as femeas, apenas fazendo saliencia no ponto em quê se encontra a genitalia. Tambem não se vê vestigio da pre-esternal. O escudo emite prolongamentos entre as coxas, mais pronunciados entre as coxas I e II, dilatando-se consideravelmente ao nivel do bordo posterior da coxa IV; ocupa quasi toda a zona ventral, da qual só deixa livre a margem lateral. As cerdas da zona esternal têm a situação habitual, medindo as anteriores, que são mais finas, 185 µ, as medias 208 µ e as posteriores 230 µ. As metaesternais têem 194 µ. As genitais medem somente 160 µ. A zona que fica daí para trás é densamente recoberta por cerca de 80 cerdas curtas e rigidas de comprimento oscilante entre 88 a 110 µ. Estreita-se o escudo holoventral na zona anal, onde toma coloração mais carregada, ai sendo vistas as cerdas habituais, a impar com cerca de 185 µ e as pares com cerca de 90 µ.

Tritosterno — Largo na base divide-se em duas lascinias estreitas, pilosas desde o ponto de bifurcação.

Estigmas ao nivel do intervalo entre as coxas III e IV.

Peritrematalia visiveis até a extremidade anterior do escudo dorsal. Face ventral descoberta com algumas cerdas curtas.

Face dorsal

Escudo do idiosoma — Muito fracamente quitinizado, mesmo na extremidade anterior, não apresentando escultura no alotipo. Na extremidade anterior os tres

pares de cerdas já descritas da ♀. Cerdas submedianas como na ♀. Cerdas submarginais muito longas, podendo atingir 205 μ, aproximadamente o mesmo tamanho das duas longas cerdas posteriores do escudo. As duas pequenas cerdas submedianas posteriores medem apenas 45 μ.

Patas

Pata I pouco alargada; coxa I com duas cerdas e serrilha no bordo distal: basifémur I com cerda mais longa, que não atinge aliás as grandes dimensões da cerda homologa da ♀.

Pata II alargada. Coxa II com cerda posterior bem mais curta do que a da ♀. Trocanteres, basifemur, telofemur, tibia e tarso com espinhos fortissimos, visiveis no tarso e no trocanter, sendo estes os unicos espinhos fortes apresentados.

Coxa III com cerda curta e fina.

Gnatosoma

Não pode ser estudado com minucia devido à retração das mandibulas. Mede 305 μ da base das *maxillicoxae* até o apice dos *cornicula*.

Mandibulas — O articulo que dá inserção às mandibulas tem 150 μ de comprimento, apresentando *pulvillus* com coroa de cerdas, que puderam ser vistas por transparencia apesar da retração das mandibulas. O *digitus fixus*, com forma de haste curva para dentro e flexivel, mede cerca de 220 μ, parecendo percorrido por um canal. Não foi possivel ver si existe um processo lateral.

Labrum — Triangular estriado longitudinalmente, piloso nos bordos, terminando em ponta fina.

Malae internae com forma de lascinias longas, pilosas.

Epistoma, paralabra e *styli* não foram vistos.

Maxillicoxae com as cerdas habituais, as postero-internas do hispostoma maiores.

Rima hypopharyngis com 12 series de dois a quatro denticulos.

Cornicula muito fracamente quitinizados e extraordinariamente alongados, terminando em ponta longa e muito fraca.

Gigantolaelaps comatus, sp. n.

(Figs. 19 e 20)

Sobre um rato silvestre não identificado, por nós capturado nas terras do Instituto Butantan, São Paulo, encontrámos um exemplar ♀ unico de uma especie do genero *Gigantolaelaps* proxima de *G. butantanensis* FONS., 1935, desta se distinguindo pelo comprimento maior das cerdas de quasi todas as regiões do corpo, como se verificará pela comparação da redescrição de *G. butantanensis* com a descrição da sp. n. abaixo apresentada.

Descrição da ♀

Idiosoma

Mede 1760 μ de comprimento por 1300 μ de largura ao nivel do IV par no holotipo, aliás um tanto achatado.

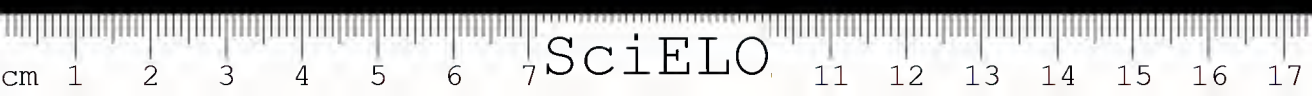
Face ventral (Fig. 19).

Placa esternal — Mede 400 μ de largura ao nivel dos angulos laterais anteriores e 480 μ ao nivel dos laterais posteriores por um comprimento de 350 μ na linha mediana até o bordo anterior da projeção anterior. A projeção anterior quasi atinge a base do tritosterno. A superficie da placa tem reticulado mais aparente nos lados; os bordos laterais e posterior são quasi retos e apenas aqueles espessados. As cerdas anteriores medem 380 μ e as medias e as posteriores 400 μ de comprimento. Pre-esternal visivel à frente e dos lados da projeção esternal, pouco quitinizada.

Metaesternais muito pouco quitinizadas, como é regra no genero, com cerdas de 370 μ de comprimento.

Genital com cerca de 520 μ, com largura maxima de 250 μ. sendo, portanto, muito pouco expandida atrás.

Anal com cerca de 220 μ de largura, por 260 μ de comprimento, mais ou menos. Anus com cerca de 80 μ e a 40 μ do bordo anterior da placa. Superficie da placa sulcada por algumas linhas longitudinais laterais, com angulos anteriores mais esculpidos. Cerdas implantadas em tuberculos, as pares situadas para trás do nivel do meio do anus e muito longas, medindo cerca de 300 μ e a impar com cerca de 370 μ de comprimento. Zona do *cribrum* larga, não ultrapassando, porém, a cerda posterior.

A zona desprotegida da face ventral é densamente cerdosa e caracterizada pelo comprimento das cerdas, o qual se torna um dos caracteristicos da especie,

medindo elas na sua maioria cerca de 205 μ e as menores 130 μ; vê-se um par ao lado do *cribrum* com 350 μ

Tritosterno largo na base, com lascinias pilosas desde a origem.

Estigmas ao nivel do intervalo entre as coxas III e IV.

Peritremas visiveis até o bordo posterior da coxa I.

Peritrematalia pouco quitinizadas, parecendo atingir a extremidade anterior do escudo dorsal.

Face dorsal (Fig. 20).

Escudo do idiosoma fracamente quitinizado, como aliás o é todo o exemplar em estudo. Deixa margem lateral descoberta e densamente revestida por cerdas longas. Superficie do escudo reticulada e esculpida. Cerdas do escudo longas, medindo as do pequeno par posterior 162 μ e a maioria 260 μ; algumas atingem 300 μ. Varias manchas circulares são vistas na superficie.

Patas

Patas I e II muito alargadas e III e IV tambem alargadas, relativamente às outras especies.

Coxa I com duas cerdas, das quais a distal fina. As duas cerdas longas do basifémur I são ainda maiores do que habitualmente, medindo 580 e 520 μ, respectivamente. Telofémur I com as duas cerdas maiores com 400 e 330 μ de comprimento. Largura do basi- e do telofêmur na articulação 260 μ. Tarso I com pelos fracos.

Coxa II com longo espinho dorsal e duas cerdas ventrais, das quais a posterior com 440 μ. Cerda do basifémur II com 380 μ e largura deste articulo, na articulação com o telofémur, 300 μ. Tarso II com cerdas longas e fortes.

As cerdas do tarso III são mais fortes e mais longas do que as do tarso II; as do tarso IV são mais longas e mais fracas do que as do tarso III.

Descrição do holotipo ♀ No. 115 da coleção do Instituto Butantan.

Gnatosoma

Mede 390 μ até o apice dos *cornicula*, não tendo sido possivel estudá-lo com minucia por só existir o holotipo.

Mandibulas largas e fortes como nas restantes especies, medindo o articulo que dá inserção aos dedos 260 μ. O *digitus mobilis* tem 135 μ de comprimento e apresenta dois dentes bem afastados entre si e do apice, que é encurvado. *Digitus fixus* com dente proximal forte e dois dentes sub-apicilares e iguais, parecendo, neste ultimo fato, diferir das especies restantes, o que não asseguramos por só termos podido observá-lo numa das mandibulas. *Pilus dentilis*

não dilatado mais proximo do dente basal. *Pulvillus* com dilatação globosa transparente e com coroa de cerdas na base do *digitus mobilis;* cerda simples, curta e larga, na base do *digitus fixus*. Entre os dedos das mandibulas uma lamina membranosa transparente, como já tem sido assinalada em outras especies.

Labrum lanceolado, estriado longitudinalmente, de ponta não muito fina, piloso nos bordos e mesmo no centro.

Paralabra — arredondadas no apice.

Maxillicoxae e *hipostoma* com as cerdas habituais.

Rima hypopharyngis com 10 series de 1 a 3 denticulos.

Redescrições

Em 1935 apresentámos à 8.ª secção do XII.° Congresso Internacional de Zoologia e publicámos nas Memorias do Instituto Butantan uma nota prévia versando sobre novos generos e especies novas de acarianos parasitas de ratos (5), em que descrevémos sumariamente tres novas especies do genero *Gigantolaelaps* por nós até aquela data observados no Brasil, os quais ainda até hoje continuaram a ser os unicos assinalados no país. No presente desdobramento do genero aproveitamos a oportunidade para uma redescrição dos holotipos, bem como para descrever um macho e um jovem e para apresentar os desenhos então prometidos.

Gigantolaelaps mattogrossensis (Fons., 1935)

sin.: *Macrolaelaps mattogrossensis* Fons., 1935

(Figs. 21-22)

Fonseca, F. da — Notas de Acareologia. XVIII. Novos generos e especies de acarianos parasitas de ratos. (*Acari. Laelaptidae*). Nota prévia *in* Mem. Inst. Butantan 10:17.1935/36.

Fonseca, F. da — New genera and species of *Acari Laelaptidae* from Brazilian rodents. *In* C. R. XIIe Congrès Intern. Zool. 3:1597.1937.

Redescrição do holotipo ♀

Gigantolaelaps mattogrossensis foi por nós originalmente descrito de material capturado em Porto Jofire, Estado de Mato Grosso, Brasil, sobre o rato *Holochilus vulpinus* Brants pelo dr. Fabio Werneck. Posteriormente tivemos oportunidade de receber a mesma especie de Crato, Estado do Ceará, Brasil, parasitando o rato *Holochilus sciureus* Wagner, capturado pelo dr. Hermann

Lent e de Tobacal, Salta, Republica Argentina, parasitando rato silvestre não determinado, capturado pelo prof. Salvador Mazza.

A especie é proxima de *Gigantolaelaps goyanensis*, sp.n., da qual se distingue pela cerda distal da coxa I, que é mais fina em *G. mattogrossensis*, e pelo comprimento da esternal, menor em *G. mattogrossensis;* tambem é proxima de *G. peruvianus* Ewing, 1933, da qual se pode distinguir por existirem em *G. mattogrossensis* duas cerdas longas no basifemur e duas no telofemur, ao passo que Ewing apenas cita uma cerda em cada um desses articulos para a sua especie, bem como pelo aspecto dos bordos posterior e anterior da placa esternal segundo se deduz da figura de Ewing (3).

Idiosoma

Especie grande, medindo o holotipo 2350 μ até o apice dos palpos, bem quitinizada, bastante pilosa, com algumas cerdas muito longas nas placas e nas patas.

Idiosoma com 1900 μ de comprimento, medindo a largura no holotipo, um tanto achatado pela montagem, 1529 μ ao nivel do IV par.

Face ventral (Fig. 21).

Placa esternal muito quitinizada, de bordos laterais levemente concavos e posterior ligeiramente convexo, ambos espessados. Bordo anterior com forte projeção mediana que ocupa quasi toda a zona pre-esternal, não chegando, porém, a atingir a base do tritosterno, circundada por uma pre-esternal de quitinização fraca. Angulos antero-laterais mais proeminentes. Superficie da placa reticulada um pouco menos quitinizada ao nivel da projeção mediana anterior. A placa mede 370 μ de largura ao nivel dos angulos antero-laterais e 444 μ ao nivel dos postero-laterais, tendo comprimento de 310 μ no holotipo e de 260 μ a 330 μ em outros exemplares examinados; permite, portanto, distinção com *G. goyanensis*, como já foi frisado. Das cerdas as anteriores têm 325 μ, as medias 347 μ e as posteriores 350 μ, tendo o mesmo aspecto das restantes especies do genero. A projeção esternal anterior tem 88 μ de comprimento por cerca de 295 μ de largura na base. Poros com situação e forma habituais.

A *pre-esternal* aparece mais nitidamente do que em *G. goyanensis*, sob a forma de faixa estriada que margea a projeção anterior da placa esternal.

Metaesternais quitinizadas ao nivel do bordo posterior da coxa III, onde se implantam cerdas com 320 μ, apresentando prolongamentos finos anteriores e posteriores.

Tritosterno de base larga, com lascinias pilosas desde o ponto de bifurcação, atingindo o nivel das cerdas posteriores do hipostoma.

Genito-ventral — Com cerca de 555 μ de comprimento por 300 μ de largura e um pouco mais expandida atrás do que em *G. goyanensis*, verificando-se, porém, certa variação de largura em outros exemplares, nos quais é mais estreita do que no holotipo. A quitinização é menor do que a da esternal, o reticulo largo e a escultura representada por tres manchas mais claras ao nivel das cerdas genitais, tres de cada lado, bem separadas. Cerdas genitais com 280 μ. Ao nivel do rebordo posterior ha depressões correspondentes à implantação das cerdas no tegumento mais proximo da placa. Vêem-se ainda no holotipo duas pequenas plaquetas de cada lado entre a genito-ventral e as inguinais e mais uma quasi encostada à genito-ventral.

Anal separada do bordo posterior da genito-ventral por intervalo de 407 μ no holotipo. O seu comprimento é impossivel de medir no holotipo por acompanhar o bordo posterior do idiosoma, apresentando a maior largura de 236 μ. A forma geral é triangular, a superficie é reticulada e os bordos laterais mais quitinizados, principalmente ao nivel dos angulos anteriores, onde fazem saliencia. Bordo anterior levemente convexo com depressão central. Cerdas pares ao nivel do meio do anus, com 185 μ de comprimento e cerda impar com 310 μ. Anus a cerca de 50 μ do bordo anterior da placa.

Cerdas da zona ventral descoberta numerosas, medindo cerca de 100 a 230 μ de comprimento.

Inguinais — Placas inguinais bem quitinizadas, triangulares, com cerca de 75 μ de maior diametro.

Estigmas ao nivel do intervalo entre as coxas III e IV.

Peritremas visiveis em longa extensão.

Peritrematalia sem prolongamento posterior, com zonas mais largas, fortemente quitinizadas a partir do II par, passando para a face dorsal, onde podem ser acompanhadas até a extremidade anterior do escudo dorsal.

Face dorsal (Fig. 22).

Escudo dorsal de bordos laterais regulares, deixando larga margem lateral e posterior descoberta, de quitinização maior ao nivel da zona anterior dos bordos laterais e na extremidade anterior. Extremidade posterior levemente concava. Comprimento 1590 μ e largura de 1030 μ ao nivel do IV par As cerdas do escudo têm a disposição habitual, havendo 3 pares na extremidade anterior e cerca de 11 pares submedianos, dos quais o primeiro muito longo, com cerca de 300 μ e o posterior com 225 μ, medindo o pequeno par submediano que fica imediatamente à frente do par posterior 80 μ. Tambem as cerdas submarginais são longas. A superficie do escudo é reticulada, apresentando marcas circulares numerosas e escultura abundante.

Patas

Patas I e II alargadas.

Coxa I com espinho proximal forte com cerca de 78 μ por uma largura aproximada de 15 γ na base e uma cerda distal com cerca de 80 µ, que se afila rapidamente, terminando em ponta fina, de aspeto bem diverso de sua homologa em *G. goyanensis*. Basifemur I com duas longas cerdas de 405 e 370 γ, respectivamente, e telofemur tambem com duas de 260 e 330 μ. respectivamente. Tarso I com pêlos finos.

Pata II muito alargada. Coxa II com cerda posterior de 407 μ. No rebordo anterior da coxa II um espinho largo dorsal. Bordo distal do meio do articulo com denticulos. Basi- e telofémur com uma cerda mais longa cada um, medindo, respectivamente, 405 e 185 μ. Tarso II com cerdas fortes e uma longa basal de 205 μ. Coxa III com os dois espinhos fortes habituais e tarsos com espinhos mais longos e mais finos do que os da coxa II. Coxa IV com uma cerda e tarso IV com cerdas longas e finas.

Redescrição do holotipo que se encontra em nossa coleção no Instituto Butantan, sob o No. 15.

Gnatosoma

Excetuadas as mandibulas e o epistoma, que não puderam ser examinados no holotipo, coincide a descrição do gnatosoma com a apresentada para *G. goyanensis*.

Gigantolaelaps butantanensis (Fons., 1935)

Sn.: *Macrolaelaps butantannensis* Fons, 1935

(Figs. 23-27)

Fonseca, F. da — Notas de Acareologia. XVIII. Novos generos e especies de acarianos parasitas de ratos (*Acari. Laelaptidae*). Nota previa in: Mem. Inst. Butantan **10**:17.1935/36.

Fonseca, F. da — New genera and species of *Acari Laelaptidae* from Brazilian rodents. *In* C. R. XIIe Congrès Intern. Zool. 3:1597.1937.

Originalmente foi esta especie por nós descrita em 1935 (5) de material capturado sobre o rato silvestre *Oryzomys eliurus* Wagner (No. 266), em Butantan, S. Paulo, Brasil. Posteriormente obtivemos material de ratos não determinados dos suburbios da cidade de S. Paulo e de Barra do Rio S. Domingos, Estado de Goiás. Um ♂ foi capturado no laboratorio.

Tambem esta especie se aproxima de outra aqui descrita, *Gigantolaelaps comatus*, sp.n., da qual a distinguem sobretudo as longas cerdas da face ventral nesta ultima especie.

Redescrição do holotipo ♀

Especie de tamanho normal para o genero, medindo o holotipo, aliás um pouco achatado pelo processo de montagem, 2350 μ até o apice dos palpos ou cerca de 2100 μ até o apice dos *cornicula*.

Idiosoma

Com 1920 μ de comprimento; a largura no holtipo é de 1500 μ, não devendo, na realidade, ultrapassar 1300 μ, dado o desconto devido ao achatamento do exemplar.

Face ventral (Fig. 23).

Placa esternal com o aspecto normal no genero, medindo cerca de 400 μ de largura na altura dos angulos antero-laterais e cerca de 510 μ ao nivel dos posteriores, por um comprimento de 320 μ na linha mediana, até o bordo da projeção anterior. A projeção mediana anterior mede cerca de 90 μ de comprimento por cerca de 240 μ de largura na base, atingindo o tritosterno. Da pre- esternal apenas se vê uma faixa que circunda a projeção da esternal. Par de cerdas anteriores com cerca de 340 μ de comprimento, inserindo-se já na projeção anterior; par medio com 370 μ e posterior com cerca de 350 μ de comprimento. A superficie da placa é reticulada e os bordos posterior e laterais muito espessados. Entre as coxas I e II ha prolongamento de curta extensão. Poros de situação normal.

Metaesternais fracamente quitinizadas, alargadas, com cerdas de cerca de 350 μ iguais às cerdas esternais.

Genital — Com 450 μ de comprimento ou 550 μ incluindo o *epigynum* por 260 μ de maior largura, sendo de 225 μ a menor largura; a dilatação posterior é, portanto, insignificante. O par de cerdas genitais mede 290 μ. A superficie da placa pareceu-nos lisa, mas estando o exemplar montado com a face ventral para baixo, a nitidez obtida no exame com aumento forte foi prejudicada, não tendo sido possivel o exame com o mesmo aumento através da lamina por não dar a sua espessura distancia focal suficiente. Tres manchas claras submedianas de cada lado na altura do par genital constituem toda a escultura desta placa. O pequeno alargamento da sua porção posterior faz com que as cerdas da super-

ficie ventral descoberta fiquem suficientemente afastadas da placa para que esta quasi não apresente impressões.

Anal — Acha-se a cerca de 380 μ do bordo posterior da genital no holotipo, que é uma ♀ gravida, com larva vista por transparencia. Comprimento 280 μ por 240 μ de maior largura, com anus a cerca de 30 μ do bordo anterior. Cerdas pares ao nivel da extremidade posterior do anus, com 200 μ de comprimento. Cerda impar com 340 μ. *Cribrum* não ultrapassa o ponto da implantação desta cerda. Superficie da placa reticulada, com angulos de aspecto pontilhado. Superficie ventral descoberta com cerdas numerosas de 125 μ até 300 μ, comprimento este atingido apenas pelas sub-medianas posteriores, medindo 190 μ o par que fica à frente da anal.

Estigmas ao nivel do intervalo entre o II e o IV par de coxas.

Peritrema com tubo visivel até o bordo posterior da coxa I.

Peritrematalia sem prolongamento posterior visivel, muito quitinizada na frente, atingindo a extremidade anterior do escudo dorsal.

Face dorsal (Fig. 24).

Escudo dorsal — Extremidade anterior afilada e posterior com reintrancia em angulo obtuso, com 1650 μ de comprimento por 960 μ de largura ao nivel do IV par, deixando descobertas as zonas marginal anterior e posterior. A superficie é reticulada e apresenta escultura de manchas claras, mais abundantes na zona anterior. A extremidade anterior, fortemente quitinizada, apresenta os 3 pares de cerdas habituais e um par de poros. O par submediano que se segue a estas é muito longo, tendo 330 μ de comprimento. O par submediano posterior mede 280 μ e o pequeno par liso para trás deste mede 162 μ, sendo, portanto, bem maior do que habitualmente e comparavel ao do *Gigantolaelaps comatus*, sp.n.. As restantes cerdas do escudo são todas muito longas, medindo a maioria 260 a 300 γ.

Patas

1.º e 2.º pares alargados.

Coxa I com 2 cerdas, das quais a distal muito mais fina. Basifémur I com uma cerda extremamente longa, de 540 μ, e outra quasi do mesmo tamanho, com 495 μ. Telofémur I com 220 μ de largura, apresentando uma cerda de 370 μ e outras de 240 μ; vêem-se em ambos os articulos ainda outras cerdas fortes, porém, mais curtas. Tarso I com pêlos finos.

Coxa II com duas cerdas, das quais a posterior com 380 μ, e a anterior curta. Basifémur II com cerda de 260 μ de comprimento. Telofémur II com 260 μ de maior largura e uma cerda dorsal de 185 μ. Tarso com cerdas fortes, espiniformes.

Coxa III com 2 espinhos e tarso III com cerdas mais longas e fortes do que as do tarso II.

Coxa IV com uma só cerda; tarso IV com cerdas muito longas e finas. Todos os tarsos com *pulvillus* e garras fortes, excetuando o tarso I, em que as garras são mais fracas.

Gnatosoma

Mede 400 μ até o apice dos *cornicula* e cerca de 640 μ até o apice dos palpos.

Mandibulas (Fig. 25) — O articulo que dá inserção às mandibulas mede 300 μ de comprimento por 75 μ de largura, apresentando *pulvillus* com coroa de cerdas na base do *digitus mobilis* e cerda curta na base do *digitus fixus*. *Digitus mobilis* de extremidade encurvada com dois dentes bem afastados e distanciados do apice. *Digitus fixus* com um dente subterminal, um muito pequeno logo para trás deste e outro, o maior, bem distanciado; o *pilus dentilis*, não dilatado, está implantado entre os dois ultimos citados.

Labrum com a forma lanceolada habitual, estriado no sentido longitudinal e piloso nos bordos.

Styli em forma de hastes levemente encurvadas para dentro e de situação externa.

As restantes peças não são visiveis no holotipo.

Descrição do ♂

(Figs. 26-27)

O unico macho encontrado entre numerosos exemplares femeas examinados de muitos hospedeiros, era do rato silvestre não determinado No. 413, por nós capturado em Butantan, S. Paulo a 12-VII-34.

Tal como o ♂ de *Gigantolaelaps gilmorei* é acariano de contorno quasi eliptico, de extremidade anterior mais afilada, sem ombros, de corpo cerdoso, sendo, porém, as cerdas finas; só na pata II foram vistos espinhos.

Idiosoma

O idiosoma mede 1508 μ de comprimento por 1100 μ de maior largura ao nivel da coxa IV.

Face ventral (Fig. 26).

Tritosterno fino, bifurcado, relativamente curto, filamentoso.

Placas ventrais fundidas, com quitinização media, reticuladas. Zona esternal com projeção anterior tal como nas femeas do genero, porém muito menos pronunciada, ficando quasi toda ela ocupada pela abertura do orgão genital masculino, diferindo, portanto, êsse aspecto do de *Gigantolaelaps gilmorei*, sp. n., no qual não existe tal projeção no ♂. Bordos laterais da zona esternal um tanto espessadas. Cerdas anteriores da esternal com 230 μ, implantadas nos limites inferiores da projeção. Cerdas medias com 244 μ e cerdas posteriores, um tanto desiguais, com 244 μ de um lado e 260 μ do outro. À frente da esternal vê-se claramente a pre-esternal de quitinização fraca, deprimida no centro do bordo anterior, não tocando o tritosterno. Cerdas metaesternais com 220 μ e cerdas genitais com 228 μ. A zona ventral expande-se logo atrás das patas do IV par, cobrindo toda a região até a zona inguinal; estreita-se gradativamente para trás até a anal, com bordos ondulosos e com reintrancias. Na sua superficie encontram-se cerca de 70 cerdas finas de 105 a 150 μ, havendo, portanto, menos cerdas nesta região do que em *Gigantolaelaps gilmorei*. A anal distingue-se da ventral pelo reticulo mais alongado, seu contorno é mais arredondado do que o de *Gigantolaelaps gilmorei*, não ultrapassando o *cribrum* o nivel da implantação da cerda impar. O anus, eliptico, mede 70 μ. As cerdas pares ficam ao nivel da extremidade posterior do anus e medem 135 μ e a impar, fina e flexivel, como, aliás, tambem as pares, mede 220 μ.

Estigmas ao nivel do intervalo entre as coxas III e IV.

Peritrema visivel até o meio da coxa II.

Peritrematalia visiveis até a extremidade anterior do escudo, mais quitinizadas da coxa II em diante, com zona mais alargada entre as coxas II e III, não tendo sido visto prolongamento posterior aos estigmas.

Face dorsal (Fig. 27).

Escudo dorsal recobre quasi todo o idiosoma, mede 1470 μ de comprimento por 920 μ de largura ao nivel do IV par, distinguindo-se do de *Gigantolaelaps gilmorei* principalmente por apresentar a extremidade posterior chanfrada como na ♀, sendo apenas esta chanfradura menos pronunciada.

A pilosidade é escassa, sendo as cerdas finas e longas. As pequenas cerdas do par submediano posterior medem 76 μ, sendo, portanto, um pouco menores do que em *Gigantolaelaps gilmorei*. A superficie do escudo é reticulada, apresenta escultura mais abundante na zona media da metade anterior e tem alguns pares de marcas circulares.

Patas

Relativamente finas, só sendo ligeiramente alargada a pata II.

Pata I com duas cerdas longas na face dorsal do basifémur, com 250 e 175 μ respectivamente, sem espinhos; tarso I com pêlos finos.

Pata II um tanto alargada, basifemur II com uma cerda longa dorsal, com 168 μ, e um espinho curto ventral. Um espinho curto em cada um dos dois articulos seguintes; tarso II com dois espinhos fortes, dos quais o maior mediano, ventral, com 52 μ, e cerdas fortes.

Tarso III com cerdas mais fortes do que os do tarso II e tarso IV com cerdas mais longas, porém mais fracas do que as do tarso III.

Alotipo ♂ No. 1002 da coleção do Instituto Butantan.

Gnatosoma

Não poude ser examinado com minucia por ter sofrido distorsão no alotipo.

Maxillicoxae com as cerdas habituais, sendo as *posteriores internae hypostomatis* as mais largas.

Cornicula pouco quitinizados e muito alongados, tal como em *Gigantolaelaps gilmorei*, sp n., lembrando o aspecto dos *cornicula* dos ♂ ♂ de *Ixobioides butantanensis* Fons., 1934.

Paralabra arredondados no apice, membranosos, com alguns pêlos curtos na ponta.

Malae internae curtas, pouco visiveis.

Styli invisiveis.

Mandibulas com dedos fixos curtos, largos, parecendo percorridos por um canal com um prolongamento curto e fino na união do terço anterior com os dois terços posteriores, no lado interno.

Epistoma membranoso, afilado no apice.

Deutoninfa

Só dois exemplares foram encontrados em abundante material examinado, não tendo sido vistas as outras fases, protoninfa e larva.

Os caracteres gerais concordam com os das femeas, ás quais muito se assemelham, sendo, porém, a quitinização bem menor; medem cerca de 1450 μ até os *cornicula*.

Idiosoma

Bem mais longo do que largo, com 1320 μ de comprimento.

Face ventral

Esterno-metaesternal — De quitinização muito fraca, com largura maxima da zona esternal de 214 μ, estreitada na zona metaesternal, com forma geral de uma raqueta, medindo de comprimento 440 μ; atinge o nivel das cerdas genitais. Cerdas anteriores com 148 μ, medias com 170 μ e posteriores com 165 μ. Não ha projeção do bordo anterior como nas ♀ ♀.

Pre-esternal de quitinização ainda mais fraca, reticulada, atingindo a base do tritosterno.

Cerdas da zona metaesternal com 130 μ e da zona genital com 110 μ de comprimento.

Anal triangular, de bordo anterior quasi plano, com 185 μ de comprimento por 170 μ de largura, de superficie reticulada, com anus a 50 μ do bordo anterior. Cerdas pares situadas em nivel um pouco posterior ao meio do anus, medindo 122 μ e cerda impar 165 μ. *Cribrum* subindo lateralmente até o nivel da cerda impar.

Estigmas ao nivel do IV par de coxas.

Peritrema com tubo fino, visivel até a coxa I.

Peritrematalia muito menos quitinizadas do que nas ♀ ♀, visiveis até a coxa I.

Tritosterno largo na base, com lascinias longas, pilosas desde o seu ponto de origem.

Face dorsal

Escudo dorsal cobrindo quasi todo o idiosoma, reticulado, pouco quitinizado, bastante esculpido; mede 1320 μ de comprimento por 740 μ de largura ao nivel do IV par. As cerdas apresentam aspecto muito semelhante às das ♀ ♀, medindo o par posterior 170 μ e o pequeno par logo à frente deste 68 μ. O escudo não é tão pontudo na extremidade anterior, nem tão quitinizado como nas ♀ ♀ e o par medio das cerdas desta extremidade acha-se nitidamente desviado para fóra. As cerdas laterais do escudo são maiores do que as submedianas, exceto o primeiro par submediano que é longo.

Patas

As coxas não têm espinhos, apenas apresentando as cerdas habituais. A cerda posterior da coxa II não tem o desenvolvimento exagerado que se veri-

fica na ♀. O basifemur I tem duas certas mais longas, a maior das quais não ultrapassa, porém, 130 μ de comprimento. Telofemur I sem cerdas longas. Basifemur II com uma cerda um pouco maior, com 108 μ. Dos tarsos o do 3.º par apresenta cerdas mais fortes. Das patas apenas a pata II é um tanto alargada.

Deutoninfa descrita de exemplares capturados sobre os ratos silvestres *Zygodontomys lasiurus* LUND. No. 744 e rato não determinado No. 800, ao lado de ♀ ♀ de *Gigantolaelaps butantanensis*, em Butantan, Estado de S. Paulo, Nos. 1004 e 1007 da coleção do Instituto Butantan.

Gnatosoma

Tanto quanto foi possivel examiná-lo sem dissecção, não apresentou diferença do da ♀, parecendo-nos, todavia, o *labrum* mais curto e mais desenvolvidas as *malae internae*. Os dentes do *digitus fixus* tambem não puderam ser examinados devido à má posição das mandibulas.

Gigantolaelaps brachyspinosus (FONS., 1935)

sin.: *Macrolaelaps brachyspinosus* FONS., 1935

(Figs. 28-30).

FONSECA, F. da — Notas de Acareologia. XVIII. Novos generos e especies de acarianos parasitas de ratos (*Acari. Laelaptidae*). Nota previa *in* Mem. Inst. Butantan **10**:17.1935/36.

FONSECA, F. da — New genera and species of *Acari Laelaptidae* from Brazilian rodents. *In* C. R. XIIe Congrès Intern. Zool. **3**:1597.1937.

Desta especie só é conhecido o holotipo ♀, capturado em Porto Joffre, Estado de Mato Grosso, pelo dr. Fabio Werneck sobre o rato silvestre *Holochilus vulpinus* BRANTS, holotipo este mal conservado, com falta de patas e de numerosas cerdas, figurando em nossa coleção no Instituto Butantan sob o No. 16.

Caracteriza a especie o fato de apresentar espinhos fortes nas zonas não quitinizadas do corpo, principalmente nas margens laterais do idiosoma, bem como verdadeiros esporões no tarso II.

Idiosoma

Mede 1770 μ de comprimento por cerca de 1300 μ de largura.

Face ventral (Fig. 28).

Placa esternal — Apresenta os angulos antero-laterais e postero-laterais salientes, bem como duas projeções sub-medianas no bordo posterior, as quais se vêem esboçadas em algumas outras especies do genero. A projeção mediana do bordo anterior atinge a base do tritosterno. A placa mede 300 μ de largura ao nivel do par anterior de cerdas e 420 μ ao nivel dos angulos postero-laterais. O comprimento na linha media é de 260 μ. Das cerdas desta placa apenas uma posterior está conservada no holotipo, medindo 340 μ de comprimento.

Metaesternais pouco quitinizadas, com cerdas de 300 μ.

Genital curta, com cerca de 460 μ de comprimento por 200 μ de maior largura, sendo, portanto, muito pouco expandida posteriormente. Na zona das cerdas genitais ha algumas manchas esculturais, não parecendo a placa ser reticulada. As cerdas genitais, fraturadas na base, não puderam ser medidas.

Anal a cerca de 370 μ da genital com cerca de 220 μ de comprimento por 200 μ de largura, com angulos espessados e cerdas pares ao nivel do bordo posterior do anus e não ao nivel do meio do anus como é dito na descrição original. Anus a cerca de 35 μ do bordo anterior da placa e com 65 μ de comprimento. As cerdas anais não existem mais no holotipo, vendo-se pela implantação que a impar deve ser maior. A zona do *cribrum* não vae além da implantação da cerda impar.

Tritosterno largo na base e com lascinias pilosas desde a emergencia.

Cerdas da zona descoberta da face ventral distintas nas zonas mediana e submediana e nas laterais, sendo naquelas finas, com cerca de 4 μ apenas de largura na base e nestas largas, verdadeiros espinhos de cerca de 80 μ de comprimento por 10 μ de largura, atingindo a maior largura na zona lateral anterior do idiosoma. Um par submediano posterior é fino e longo, medindo 160 μ de comprimento.

Estigmas na altura do intervalo entre as coxas III e IV.

Tubo do peritrema visivel até o bordo posterior da coxa I.

Peritrematalia visivel até a extremidade anterior do escudo dorsal.

Face dorsal (Fig. 29).

Escudo dorsal com 1350 μ de comprimento por 790 μ de largura, com extremidade posterior truncada, superficie reticulada, com escultura abundante. Das cerdas do escudo apenas se pode dizer que devem ser largas, o que se ajuiza pelas marcas de implantação, e que o par submediano posterior de cerdas pequenas mede 75 μ.

A zona lateral anterior descoberta da face dorsal apresenta, como a ventral, numerosos espinhos fortes que caracterizam a especie.

Patas

Patas I e II alargadas.

Na coxa I só a cerda distal, fina, está conservada. Nos basi- e telofemur I, ambos alargados, vêem-se implantações de cerdas fortes, partidas na base. Tarso I com pêlos finos.

Coxa II com cerda posterior de 180 μ. Tarso II curto e largo, com um tremendo esporão apicilar de 80 μ de comprimento por 30 μ de largura na base e outro mais estreito no meio do articulo.

Coxa III com espinho posterior largo.

Coxa IV com cerdas largas e tarso IV com cerdas espiniformes e longas.

Gnatosoma

Epistoma lamelar, largo na base e acuminado no apice.

Mandibulas (Fig. 30) — O articulo que dá inserção aos dedos das *chelicerae* mede cerca de 90 μ de maior largura e apresenta *pulvillus* com coroa de cerdas na base do *digitus mobilis* e pequena cerda larga na base do *digitus fixus*. *Digitus mobilis* de apice encurvado, com 2 dentes afastados entre si e da extremidade distal, o proximal um pouco maior. No *digitus fixus* só puderam ser vistos, talvez devido à posição das mandibulas, os dois dentes proximal e distal e um *pilus dentilis* situado entre êles.

Labrum lanceolado, piloso, estriado longitudinalmente.

Malae internae pareceram-nos ter o aspeto de lascinias pilosas.

BIBLIOGRAFIA

1. *Vitzthum, Conde H.* — Willy Kukenthal-Handbuch der Zoologie 3(2.ªm.(1)3.ª parte): 142.1931.
2. *Ewing, H. E.* — Manual of external parasites. Baillière, Tindall & Cox, London, 1929.
3. *Ewing, H. E.* — Proc. U. S. Nat. Mus. 82:2-14.1933.
4. *Vitztheum, Conde H.* — Treubia 8(1/2):1-198.1926.
5. *Fonseca, F. da* — Mem. Inst. Butantan 10:17.1935/36.
6. *Berlese, A.* — Redia 1:259.1910.
7. *Tragardh, I.* — Sjöstedt's Schwed. Zool. Exped. Kilimandjaro 3:54-59.1910.
8. *Berlese, A.* — Redia 13:129.1918.
9. *Hirst, S.* — Proc. Zool. Soc. London :971.1923.
10. *Hirst, S.* — Proc. Zool. Soc. London :49-69.1925.
11. *Oudemans, A. C.* — Ent. Berichte 1(18):169.1904 et Notes Leydi Mus. 24(9):223.1904.

Mem. Inst. Butantan
Vol. XII — 1938-39

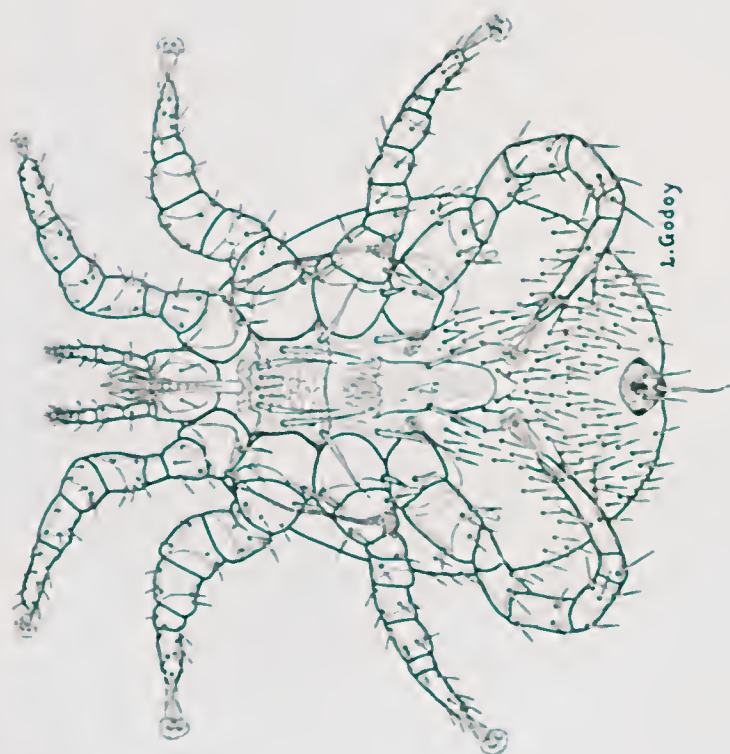



Fig. 1 — *Gigantolaelaps oudemansi*, sp. n. ♀. Face ventral

Fig. 2 — *Gigantolaelaps oudemansi*, sp. n. ♀. Mandibula

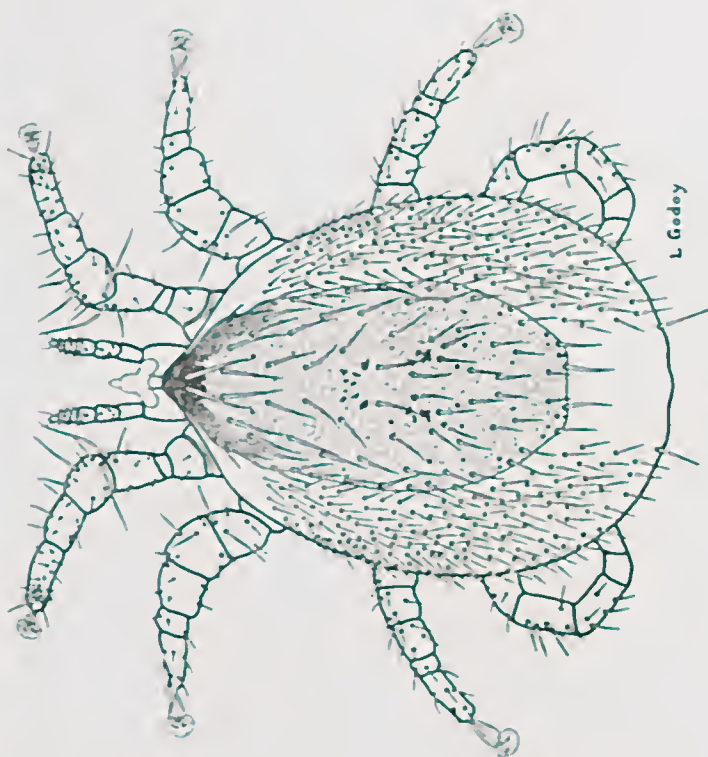



Fig. 3 — *Gigantolaelaps oudemansi*, sp. n. ♀. Face dorsal

Mem. Inst. Butantan
Vol. XII — 1938-39

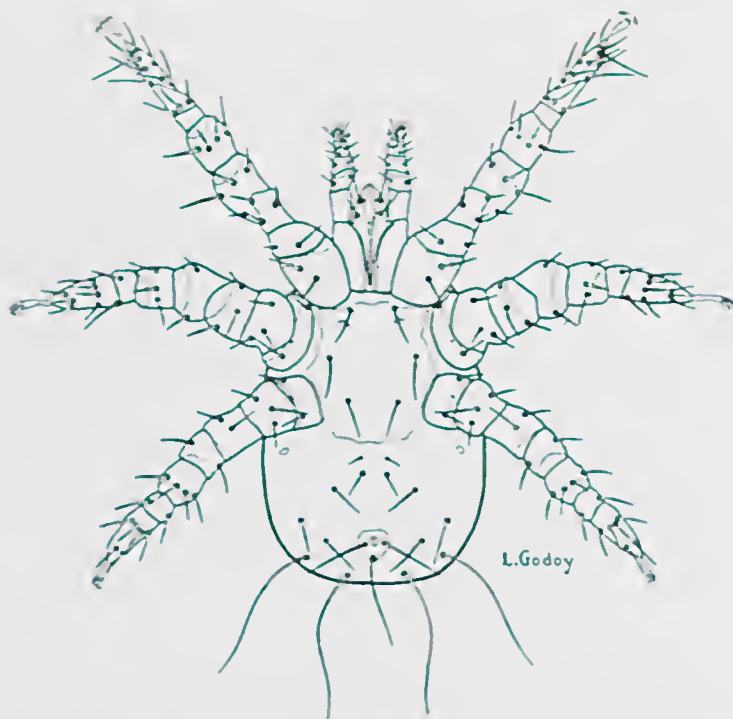



Fig. 4

Gigantolaelaps oudemansi, sp. n., larva. Face ventral

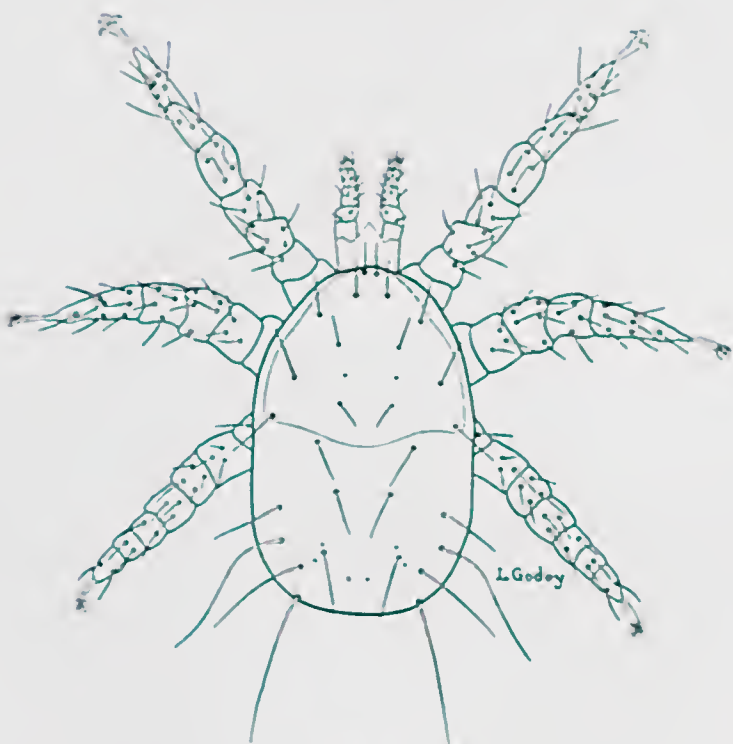



Fig. 5

Gigantolaelaps oudemansi, sp. n., larva. Face dorsal

Mem. Inst. Butantan
Vol. XII — 1938-39

Fig. 7
Gigantolaelaps gilmorei, sp. n., ♀. Face dorsal

Fig. 8
Gigantolaelaps gilmorei, sp. n.
♀. Mandibula

Fig. 6
Gigantolaelaps gilmorei, sp. n., ♀. Face ventral

Mem. Inst. Butantan
Vol. XII — 1938-39

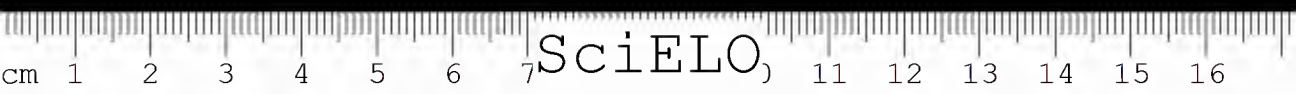



Fig. 9

Gigantolaelaps gilmorei, sp. n., ♂. Face ventral.

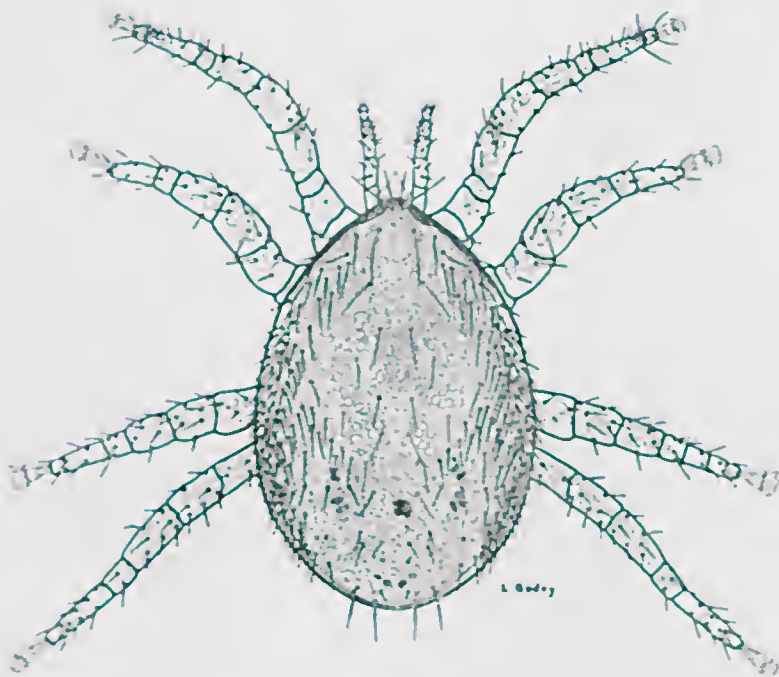



Fig. 10

Gigantolaelaps gilmorei, sp. n., ♂. Face dorsal

Mem. Inst. Butantan
Vol. XII — 1938-39

Fig. 12
Gigantolaelaps vitzthumi, sp. n., ♀. Face dorsal

Fig. 13
Gigantolaelaps vitzthumi, sp. n., ♀.
Gnatosoma

Fig. 14
Gigantolaelaps vitzthumi, sp. n., ♀.
Mandibula

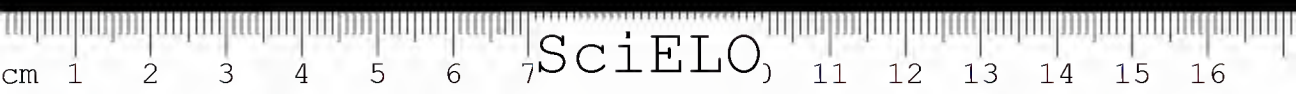
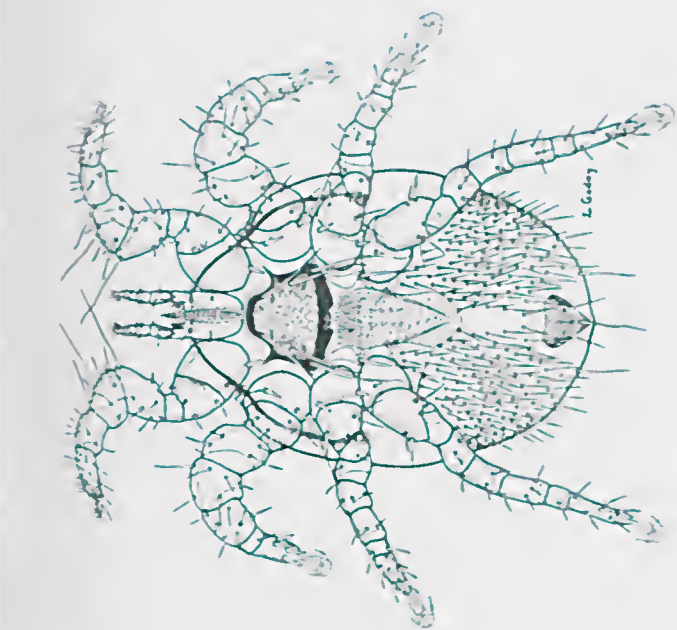



Fig. 11
Gigantolaelaps vitzthumi, sp. n., ♀. Face ventral

Mem. Inst. Butantan
Vol. XII — 1938-39

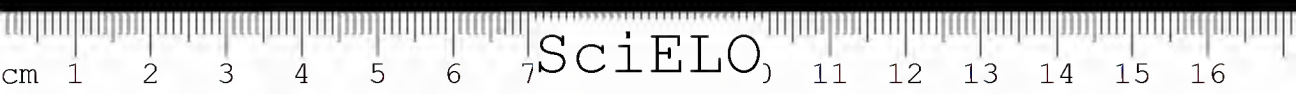
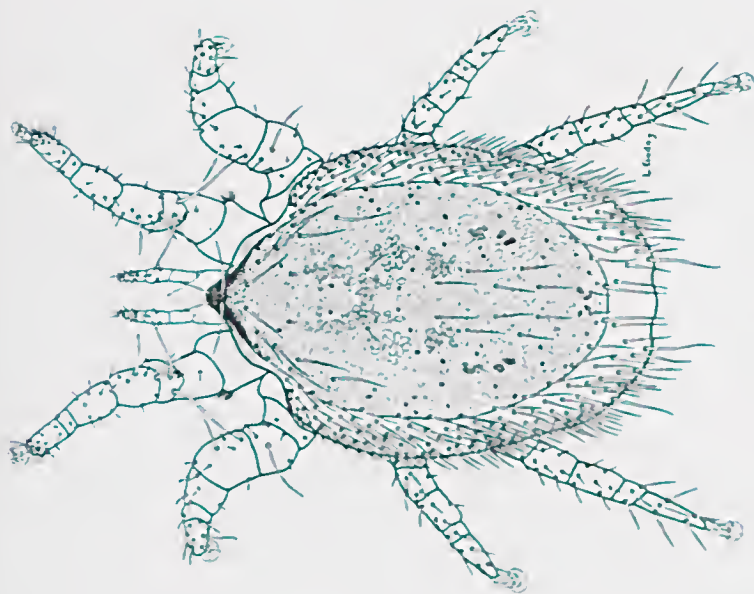



Fig. 16
Gigantolaelaps goyanensis, sp. n., ♀. Face dorsal

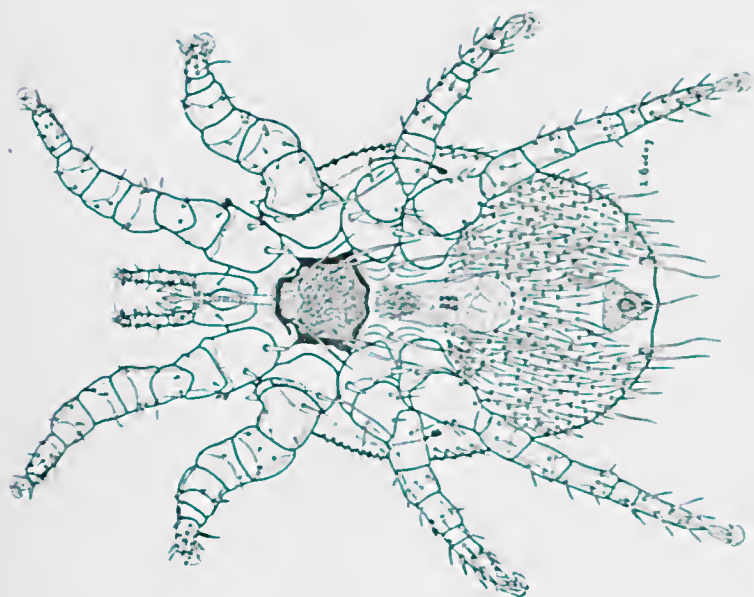



Fig. 15
Gigantolaelaps goyanensis, sp. n., ♀. Face ventral

Mem. Inst. Butantan
Vol. XII — 1938-39

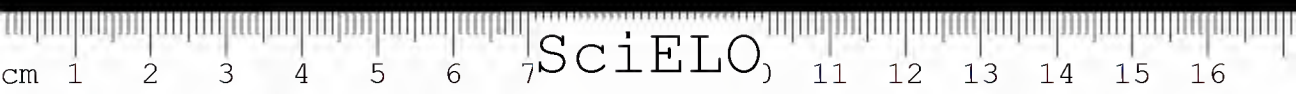
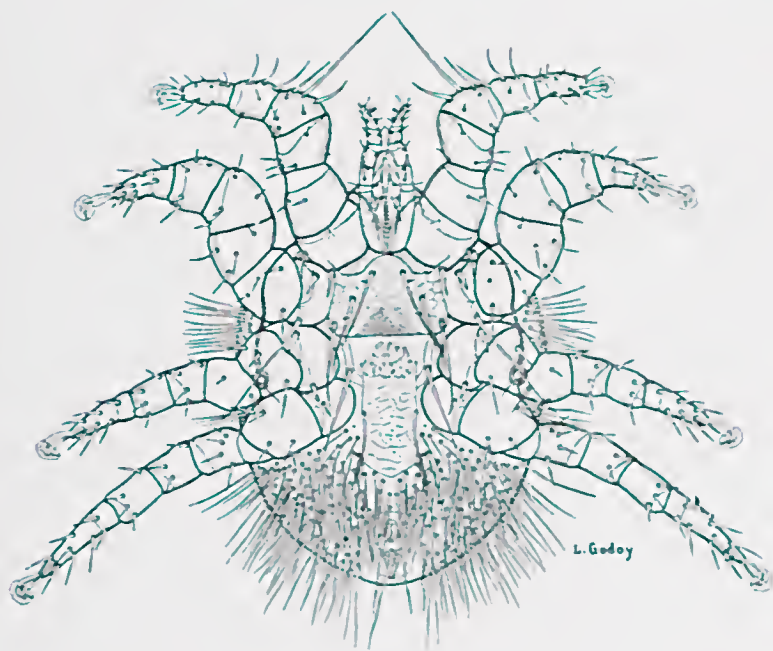



Fig. 19

Gigantolaelaps comatus, sp. n., ♀. Face ventral

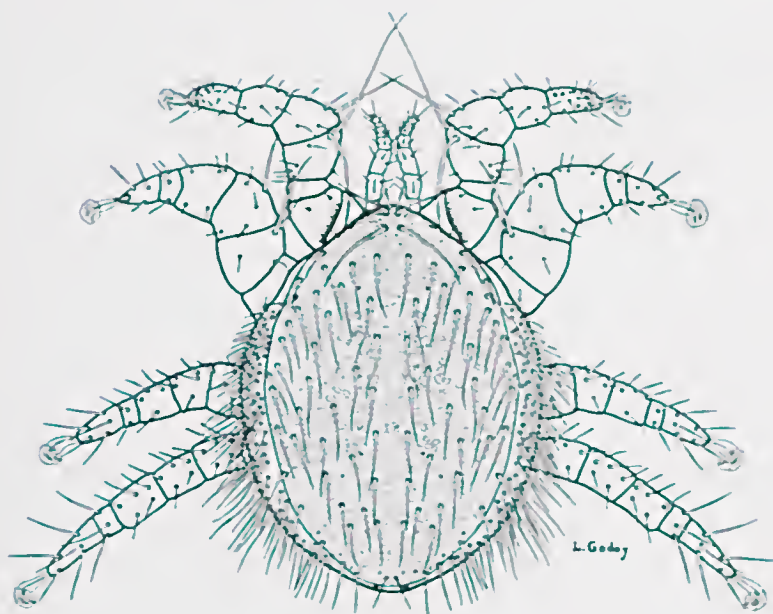



Fig. 20

Gigantolaelaps comatus, sp. n., ♀. Face dorsal

Mem. Inst. Butantan
Vol. XII — 1938-39

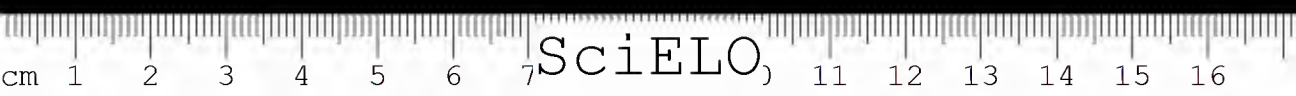
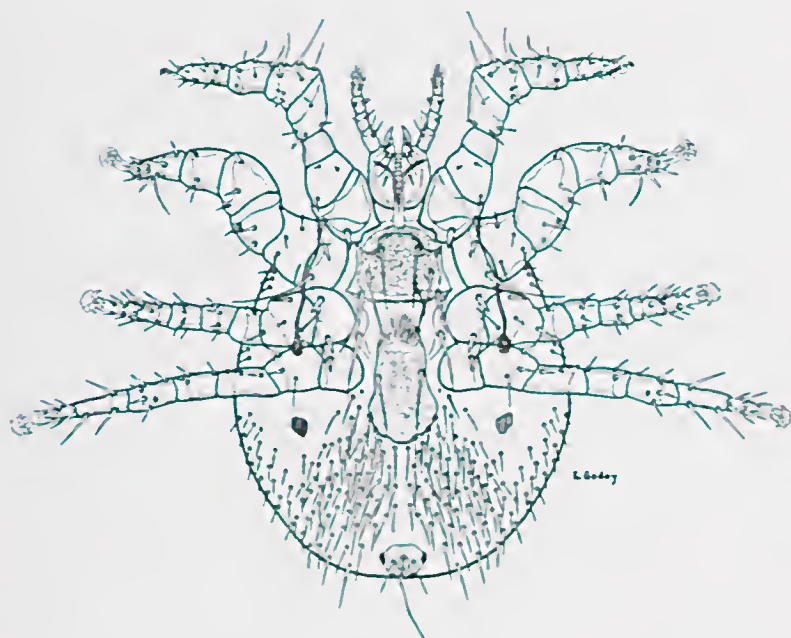



Fig. 21

Gigantolaelaps mattogrossensis (Fons., 1935). ♀. Face ventral

Fig. 22

Gigantolaelaps mattogrossensis (Fons., 1935). Face dorsal

Mem. Inst. Butantan
Vol. XII — 1938-39

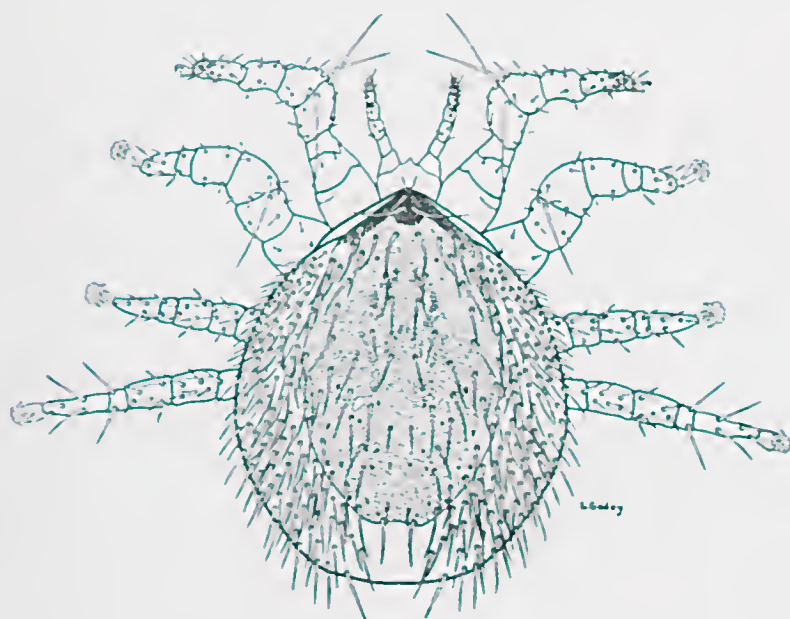
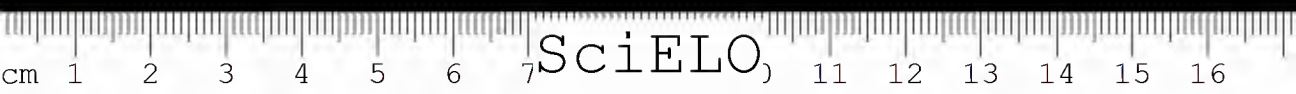
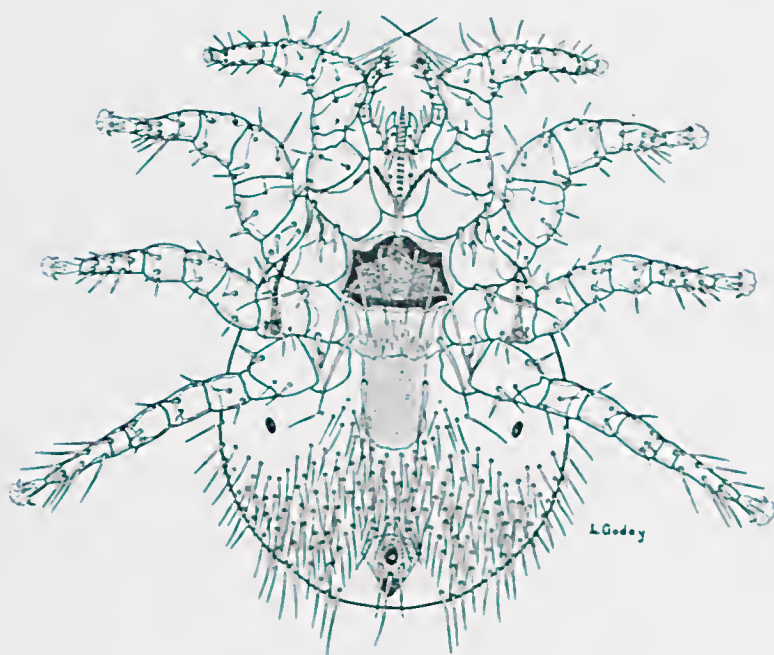



Fig. 23

Gigantolaelaps butantanensis (Fons., 1935). ♀. Face ventral

Fig. 24

Gigantolaelaps butantanensis (Fons., 1935). ♀. Face dorsal

Mem. Inst. Butantan
Vol. XII — 1938-39

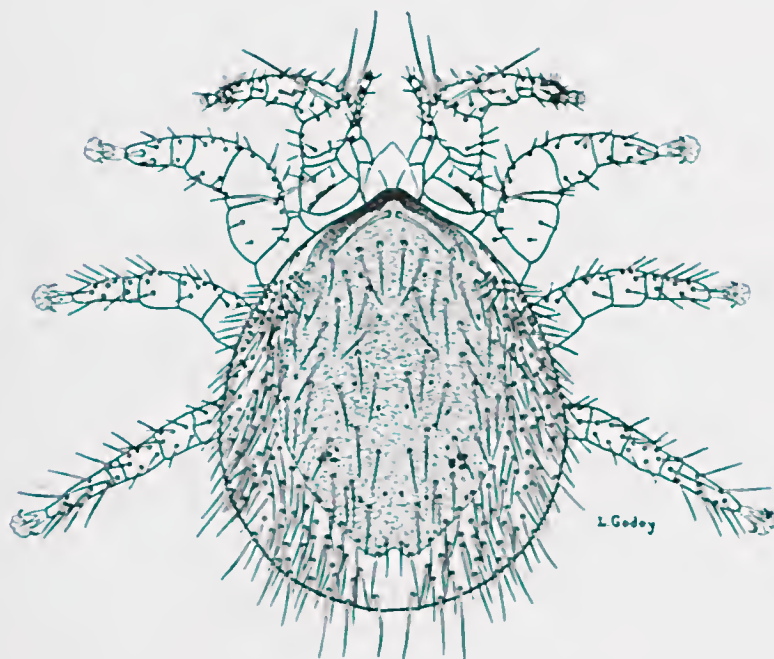
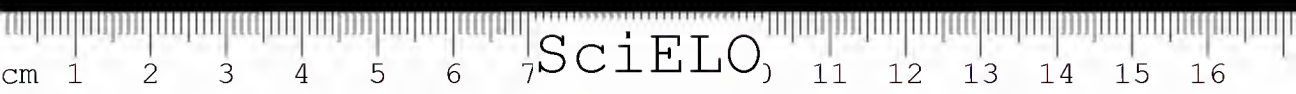
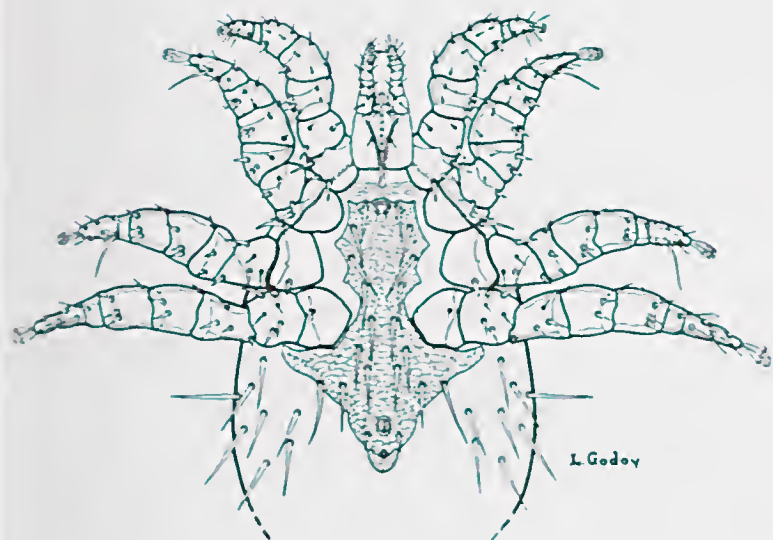



Fig. 26
Gigantolaelaps butantanensis (Fons., 1935). ♂. Face ventral

Fig. 25
Gigantolaelaps butantanensis (Fons., 1935). ♀. Mandibula

Fig. 27
Gigantolaelaps butantanensis (Fons., 1935). ♂. Face dorsal

Mem. Inst. Butantan
Vol. XII — 1938-39

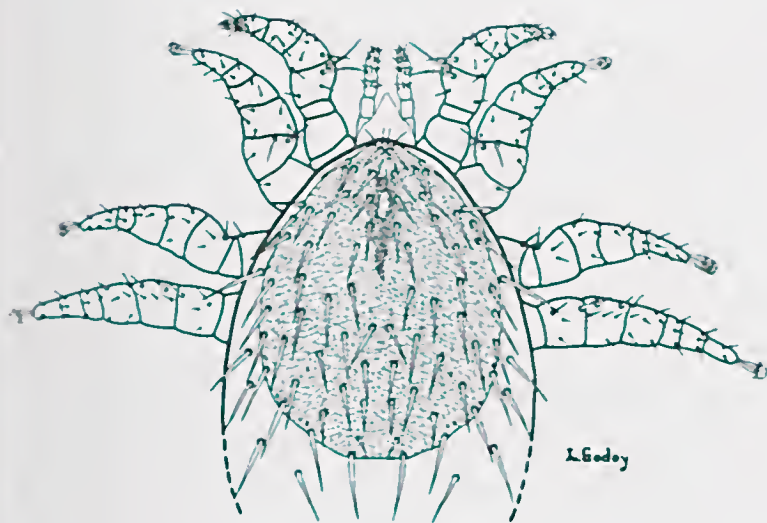
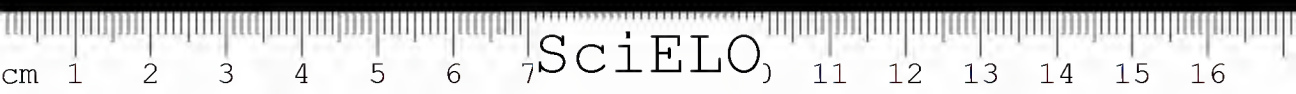
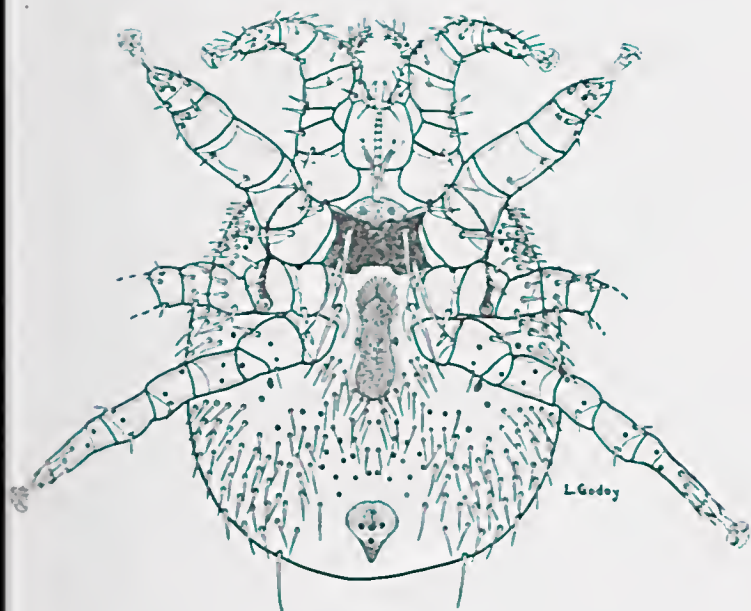



Fig. 28
Gigantolaelaps brachyspinosus (Fons., 1935). ♀. Face ventral

Fig. 30
Gigantolaelaps brachyspinosus, (Fons., 1935). ♀. Mandibula

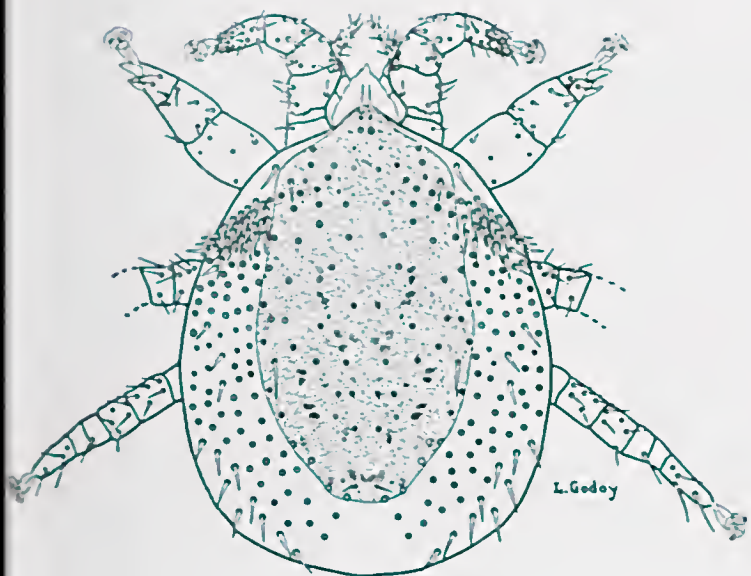
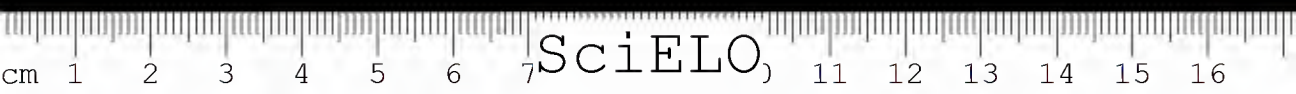



Fig. 29
Gigantolaelaps butantanensis (Fons., 1935). ♂. Face dorsal.

616.968.5:595.42

ACAROLOGICAL NOTES

XXV. The giant *Laelaptidae*, parasites of South American rodents; new genus and species (*Acari*).

BY

FLAVIO DA FONSECA

From the Instituto Butantan — S. Paulo, Brazil.

(*With 30 Figures in the text*)

CONTENTS

616.968.5:595.42

ACAROLOGICAL NOTES

XXV. The giant *Laelaptidae*, parasites of South American Rodents. New genus and species.

BY

FLAVIO DA FONSECA

Of the hundred and more families included in the order *Acari* LEACH, 1817, *Laelaptidae* BERLESE, 1892 is the one which seems to contain the greatest number of genera; those which have been described up to the present amount to nearly one hundred. In 1931 (1), Count Vitzthum had already recognized 78 genera in this family. About one quarter of this number is composed of genera, most especies of which live as parasites on vertebrates, especially on mammals. They were arranged in a very pratical key by Ewing, in 1929 (2).

Among the parasitic genera, the typical genus *Laelaps* C. L. KOCH, 1936, predominates due to the frequency in which its species are encountered, including numerous forms of rodent parasites, some of them cosmopolitan. The number of species included in the genus *Laelaps, sensu strictu,* seems to be more than thirty; this is undoubtedly the most numerous group in this family; its representatives have been studied by Ljung, Koch, Berlese, Oudemans, Trägardh, Vitzthum, Hirst, Ewing and others.

For the last 12 years, Vitzthum, Hirst, Ewing and the author were induced to describe about 15 new genera to contain certain forms of the family *Laelaptidae,* principally found on rodents.

The criterion used for the generic distinction is manifold: size, body shape, pilosity, number of setae on the genito-ventral plate, shape of this plate, presence or abcense of simple or bifid spines on the coxae, crown of setae on the *pulvillus* of the mandibulae and even presence or absence of sculpture at the dorsal shield of the females.

a) — The new genus:

Among the genera recently described, *Macrolaelaps* Ewing, 1929, which up to the present had included the largost *Laelaptidae* parasites of vertebrates, will be object of our especial attention.

Ewing, in 1929, (2), described the genus *Macrolaelaps* as follows: "Body as a whole clothed with stout setae, which tend to become thickly set along the lateral margins. Chelicerae of female very large, somewhat swollen and with a brush of setae situated near the base of the movable arm. Dorsal plate covering most of the body and irregularly sculptured over the region of the cephalothorax. Sternal plate large, heavily chitinized and extending well between third coxae. Genito-ventral plate of female large, much expanded beneath fourth coxae and with four pairs of setae. Anal plate almost circular, with three setae, the last or unpaired one being much the largest. Metapodal plates small to minute. First and second pairs of legs enlarged but not calcarate. First femora with long spines above. Type: *Laelaps sanguineus* Vitzthum".

In 1933, Ewing (3) proposed for the same genus the following diagnosis: "Body stout, but longer than broad, not subcircular; well clothed with short, spine-like setae; dorsal plate of female sculptured. Chelicerae each with a brush of setae attached near the base of the movable arm; fixed arm without recurved, fang-like seta. Sternal plate of female broad, with two pairs of pores and three pairs of setae; genito-ventral plate not reaching anal plate; anal plate about as long as broad, broadly rounded in front and pointed behind, and provided with two paired and one unpaired setae. Legs stout, provided with spine-like setae; each coxae with one or two short, peg-like spines. Type species: *Laelaps sanguineus* Vitzthum."

The first fact which strikes one's attention in Ewing's diagnosis is the name of the type species: *Laelaps sanguineus*. This is a *nomen nudum*, originated from confusion with *Laelaps* (*Laelaps*) *sanguisugus* Vitzthum, 1926 (4), which, therefore, becomes the type species as *Macrolaelaps sanguisugus* (Vitzthum, 1926).

As a difference between the two diagnosis, it should be noted that in the second one, Ewing did not point out the existence of four setae on the genito-ventral plat, nor a larger posterior expansion of this plate, the only reference being that it does not touch the anal plate; he said nothing more about the small size of the metapodal (inguinal) plates; he pointed out the existence of 1 - 2 short spines on each coxa; he affirmed, finally, that the hairs of the body are spine-like and short.

In his second diagnosis Ewing included in the genus *Macrolaelaps* the two species reported by himself, viz: *M. sanguineus* [syn.: *M. sanguisugus* (Vitzthum)] from Java and *M. peruvianus* Ewing (3) from South America.

These two species are quite close especially in view of their large size, which reaches 1530 µ in *M. sanguisugus* and 1900 µ in *M. peruvianus*, as well as of

the length of the setae on the ventral plate and the presence of long setae on femur I. There is no doubt, however, that the species of Ewing bears on the genito-ventral plate, which is less expanded behind, only one pair of setae, the genital; the setae on the ventral region are already implanted in the uncovered tegument. We can further consider that although both species present a long sternal plate reaching the base of the tritosternum, the shape of the anterior margin of their sternal plate is different thus; it is mesially protruding in the South-American species, and much more uniform in the Javanese species. Another difference to be noted between the two species is that resulting from comparison of the figure of Ewing, whose specific description is very insufficient, with the diagram and excellent description of Vitzthum, as to the setae of the coxae: whilst the South-American species bears a short, distal seta on the coxa I, the Javanese species bears a very long one, of nearly the size of the sternal setae; moreover, *M. peruvianus* has a long posterior seta on the coxa II, which we consider as a constant character of the South American species, whilst *M. sanguisugus* has a spine in that region. Still another difference to be noted is the size of the tritosternum, which is long in the species of Ewing and short in that of Vitzthum.

In the same paper of Vitzthum, in which the type species of the genus *Macrolaelaps* (4) was described, another species, likewise from Java, was defined under the name of *Laelaps (Laelaps) sculpturatus*. This is very similar to *Macrolaelaps sanguisugus*, differing from it by its smaller size, which only reaches 1340 μ and in lesser points of only specific importance; for this reason it must be included in the genus *Macrolaelaps*. The difference and resemblances observed between *M. sculpturatus* and *M. peruvianus* are those already noted as regards *M. sanguisugus*; however, in *M. sculpturatus* coxa I bears a shorter seta and the tritosternum is longer.

The present paper, which contains eight different species of giant *Laelaptidae* found in Brazil and Argentine and distinct from the Peruvian species, seems to prove the existence of a group of South-American forms sufficiently homogeneous to figure in an independent genus, though presenting great closeness, on the one hand, with the genus *Macrolaelaps*, the type species of which is *M. sanguisugus*, and on the other hand, with the genus *Laelaps*.

This group of South-American species is characterized by the large size of its species, the smallest of which we have observed, being somewhat different from the type, measures 1480 μ ; the shape of the sternal plate is always the same, with an anterior narrow projection occupying the pre-sternal zone of the idiosoma, in which a pair of anterior setae is implanted; the genito-ventral plate is always rather expanded posteriorly and does not permit the insertion of setae besides those of the genital pair; the posterior seta of the coxa II is always longer than the rest of the coxal setae, being as a rule exceptionally long. The long setae of

the plates and legs are flexible and not rigid as those of the species of Java. The *labrum* is always lanceolated and not as in *Macrolaelaps sculpturatus* (Vitzthum), in which it is divided by a constriction.

In the South American genus, characterized as above, the following species may be included: *Macrolaelaps peruvianus* Ewing, 1933, which, in spite of the insufficiency of Ewing's description, can be recognized as belonging to his group: *Macrolaelaps butantanensis* Fons., 1935; *Macrolaelaps mattogrossensis* Fons., 1935; *Macrolaelaps brachyspinosus* Fons., 1935 (5). In this group should also be included *Laelaps maximus* Berlese, 1903 (6) (caught in Montevideo on *Hesperomys vulpinus*), the size and general character of which are similar to those of the other species of this genus. Although Berlese, in referring to the genito-ventral shield, classifies it as *nudum*, we are certain that he only referred to the ventral zone of that plate, since we cannot admit the existence of any *Laelaptidae* bearing no pair of genital setae.

Also *Laelaps versteegi* Oudemans, 1904 described from *Mus* sp. of Surinam (11) certainly belongs to this genus, as follows from its large size and from the fact that it bears only the pair of genital setae in the genito-ventral plate.

It is possible that *Laelaps wolffsohni* Oudemans, 1910 should also be included in this genus, for Oudemans, in his Laelaps Studiën, mentions it as a species very similar to *Laelaps versteegi*; however, we did not have the necessary bibliography at our disposal to decide this question.

In this paper we describe five other species in addition to the above ones, thus bringing to 11 the species so far known:

1. *Gigantolaelaps maximus* (Berlese, 1902)
2. *Gigantolaelaps versteegi* (Oudemans, 1904)
3. *Gigantolaelaps peruvianus* (Ewing, 1933)
4. *Gigantolaelaps butantanensis* (Fons., 1935)
5. *Gigantolaelaps mattogrossensis* (Fons., 1935)
6. *Gigantolaelaps brachyspinosus* (Fons., 1935)
7. *Gigantolaelaps oudemansi*, sp. n.
8. *Gigantolaelaps gilmorei*, sp. n.
9. *Gigantolaelaps vitzthumi*, sp. n.
10. *Gigantolaelaps goyanensis*, sp. n.
11. *Gigantolaelaps comatus*, sp. n.

We think that the distinction of the last eight species will be easy to establish at any time; indeed, in their respective description we had already foreseen the necessity of distinguishing them from other species that might be described in the future by means of a detailed description or redescription. The same, howe-

ver, cannot be said of *Gigantolaelaps maximus* BERLESE, the description of which, if sufficient when nothing was known about South-American species, is today insufficient to distinguish it from several other forms. This is also true as regards *M. peruvianus* EWING, the description of which, exceedingly succint as the rule in the papers of this distinguished specialist, was sufficient to establish distinction at the time it was published, but proves to be insufficient when compared with the definition of many of the latest species.

As far as we can deduce from the diagnosis of Ewing for the genus *Macrolaelaps*, which we retain with its original conception (1929), and from the literature at hand, the genus *Macrolaelaps* EWING, 1929, should be reserved for the following species:

Macrolaelaps muricola (Trägårdh, 1910) (7)
Macrolaelaps giganteus (BERLESE, 1918) (8)
Macrolaelaps ugandanus (HIRST, 1923) (9)
Macrolaelaps giganteus barkeri (HIRST, 1923) (9)
Macrolaelaps grandis (HIRST, 1925) (10)
Macrolaelaps sanguisugus (VITZTHUM, 1926), type species (4)
Macrolaelaps sculpturatus (VITZTHUM, 1926) (4).

Diagnosis of the genus *Gigantolaelaps*, gen. n.

Laelaptidae close to *Macrolaelaps* EWING, 1929, and to *Laelaps* KOCH, 1836, of larger size than any other parasitic genus of this family; sternal plate narrow in front thus constituting a large anterior projection, which occupies nearly the whole or the whole pre-sternal zone and in which the setae of the anterior pair are implanted; besides the usual three pairs of sternal setae, there may exist smaller setae on this plate; genito-ventral a little expandede posteriorly, with only one pair of setae, which is the genital; the posterior seta of coxa II is always longer than the other setae of coxae, being generally extremely long. Long setae of the legs and of the plates flexible; *labrum* lanceolate.

Type species: *Gigantolaelaps vitzthumi*, sp. n.

Description of the genus.

At it may be seen from the study we made on the preceding pages of *Macrolaelaps sanguisugus* (VITZTHUM) and *Macrolaelaps sculpturatus* (VITZTHUM), on one hand, and *Macrolaelaps peruvianus* (EWING) on the other, the genus *Gigantolaelaps* presents a greater affinity with *Macrolaelaps* EWING. It is also close to the genus *Laelaps* KOCH, from which it may be distinguished by the

aspect of the sternal plate, the number of setae of the genital plate, the greater length of the setae of the plates and of some joints of the legs, and the aspect of the peritrematalia.

The lenght of the species is always considerable, exceeding the lenght of the idiosoma of the ♀♀ in all species, excepting *Gigantolaelaps oudemansi*, sp. n., of 1700 μ, at times even exceeding 2000 μ as in the case of *Gigantolaelaps vitzthumi* and in *Gigantolaelaps gilmorei*. In *Gigantolaelaps oudemansi* the size is smaller, not reaching 1500 μ. The width is also large in *Gigantolaelaps vitzthumi*, nearly 1560 μ. The male is of smaller size than the female; it is also narrower and does not show any pronounced incurvation at the shoulders, which are as a rule narrower than those of the female.

The sternal plate, always heavilly chitinized, is reticulated and presents in all species the same shape, with a large and pronounced anterior projection, covering the pre-sternal plate and frequently reaching the base of the tritosternum. The thickness of the edges, especially the anterior and the lateral, is often perceptible together with traces of a pre-sternal plate. The six usual setae of the sternal plate are extremely long, the posterior being nearly 400 μ in length in *Gigantolaelaps comatus*, sp n. A curious fact is that one species, *Gigantolaelaps oudemansi*, sp. n., presents hypertrichosis on the sternal plate of the ♀♀, similar to what is seen in *Acantochela chilensis* Ewing, 1933 and *Haemogamasus sternalis* Ewing, 1933; in all the specimens which are moreover very numerous, there can be verified the existence of three supplementary setae of smaller development between the setae of the normal anterior pair.

The metasternalia are weakly chitinized and have long setae, of the same type as the sternal plates and as flexible as these.

The genito-ventral plate is always little expanded posteriorly, in such a way that in one species, *Gigantolaelaps butantanensis*, it is reduced to the genital portion, so small it is. No setae are seen on the posterior margin; in most cases, and in some species, in which the ventral zone is more expanded, it can be seen that the setae near the ventral zone, in spite of being implanted in the uncovered tegument, depress the posterior edge of the plate, which becomes undulated. This is one of the best characteristic of the new genus, and has induced us to include here *Laelaps maximus* Berlese.

The small development of the genito-ventral plate increases the distance between this plate and the anal plate, which is the opposite to what happens with *Macrolaelaps sculpturatus* (Vitzthum), in which the proximity of the two plates recalls the aspect of *Laelaps echidninus* Berlese and, in a smaller degree, of *Macrolaelaps sanguisugus* (Vitzthum), *Macrolaelaps muricola* (Trägårdh), *Macrolaelaps grandis* (Hirst), *Macrolaelaps ugandanus* (Hirst), *Macrolaelaps barkeri* (Hirst) and *Macrolaelaps giganteus* (Berlese).

As to the anal plate, we call attention to the extensive development of the setae, principally of the unpaired, which is flexible, and to the relatively small development of the *cribrum*, which generally does not exceed the insertion of the unpaired seta. This plate is generally reticulated and has antero-external corners, which are heavier chitinized.

The inguinalia have a median development and generally are weakly chitinized.

The stigmata are in the usual place in *Laelaptidae*, being on the level of the space between the coxae III and IV. The *peritrematalia* have the peculiarity of not stretching behind the stigmata, what, however, also happens in *Macrolaelaps sanguisugus* (Vitzthum) as opposed to the species of the genus *Laelaps* Koch, in which the *peritrematalia* are prolonged behind the stigmata.

Tritosternum is always long and with filamentous lasciniae.

Of the setae of the uncovered zone of the ventral side, the more posterior are usually the larger, but there may be a pair much larger than the rest on the posterior margin of the body, as in *Gigantolaelaps gilmorei* and in *Gigantolaelaps vitzthumi*. In *Gigantolaelaps oudemansi*, however, the setae are sub-equal in that region. In *Gigantolaelaps comatus*, the setae of the uncovered ventral zone are longer than usual. The ventral zone of the region external to the coxae is generally bare, but in *Gigantolaelaps brachyspinosus* it is covered with characteristic spines.

The dorsal shield extends to near the posterior margin of the body, with the exception of *Gigantolaelaps oudemansi*, in which it ends at a certain distance from this extremity; it is relatively narrow and leaves laterally a large zone of uncovered tegument. The chitinization is heavy, principally at the anterior zone of the margins and at the anterior extremity, which is the most chitinized zone of the body, so that it has nearly a black colour. The *peritrematalia* contribute towards this aspect by uniting with the anterior zone of the shield margin. The setae present the same arrangement in all species, there being always three pairs at the anterior extremity, of which the anterior is horizontal and short, and the posterior long. It is also typical that there is always a little submedian pair of setae near the pair of setae of the posterior extremity. Clearer areolated zones establish the sculpture presented by all species and most abundant in the anterior and median zone of the shield. Circular symmetrical marks of different sizes occur in the shield of idiosoma in all species. The uncovered zone of the dorsal side has setae and, in *Gigantolaelaps brachyspinosus*, real spines.

When it was possible to examine in detail the gnathosoma, this always presented a large homogenity of characters.

The epistoma is membranous, broad at the base and pointed at the apex. Stout and enlarged mandibulae with a setae crown of in the *pulvilli* and single seta near the insertion of the *digitus firus*. *Digitus mobilis* with two strong

teeth and *digitus fixus* with three, the middle one generally very small. *Pilus dentilis* not inflated in the *digitus fixus*. It is common to see a transparent globose formation in the *pulvilli* and a membrane between the stems of the scissors formed by the two fingers. *Styli* in form of a short stem of external situation. Triangular, lanceolate, longitudinally grooved *labrum* with pilous margins. Broad *paralabra*. *Malae internae* in form of pilous lasciniae. The postero-internal setae are the longest of the hypostoma. The *rima hypopharyngis* has always always series of denticles.

The legs of pairs I and II are usually enlarged; the opposite may take place, however, as in *Gigantolaelaps gilmorei*. The pair IV is always the longest. The coxae may be only setous or have spines, the posterior seta of coxa II being characteristic in the genus, and often exceptionally long, the only exception being *Gigantolaelaps oudemansi*, in which, however, it is still much longer than any other setae of the coxae. In the basi- and telo-femura of the legs I, there are always extremely long dorsal setae, generally two in each of these joints; there are, however, also long seta in the basifemur II. The tarsi of the first pair have only fine hair. The tarsi II have long setae, which are stronger than in any other pair of legs. The setae of the tarsi III are longer than those of the tarsi II, but a little weaker. The tarsus IV has long and thin setae. In *Gigantolaelaps brachyspinosus* there are stout spines and spurs in tarsus II. The claws are weaker in tarsus I.

The genus has a very large geographic distribution in South-America, species being already known from Perú, the North, South and Centre of Brazil, Argentine and Uruguay.

They seem to be exclusively parasites of field-rats, having never been found on domestic rats. The fact that the *Gigantolaelaps goyanensis*, sp. n., has been found as a parasite on the *Metachirops opossum*, must be accidental. The infestation with species of this genus is generally moderate, a large number of specimens being an exception.

It is interesting to note the rarity of finding ♂♂ and young specimens, even after a minute research, this, however, should not he ascribed only to the fact that the ♂♂ are smaller, and therefore more difficult to find.

Gigantolaelaps oudemansi, sp. n., a larviparous species, is the only one on which larves were found.

b) — Description of the new species

Gigantolaelaps oudemansi, sp. n.

Whilst studying the epidemiology of the jungle yellow fever, Mr. R. M. Gilmore, of the Rockefeller Foundation, caught in Annapolis, State of Goyaz,

several *Laelaptidae*, in which *Macrolaelaps goyanensis*, sp. n., predominated besides two other new species. *Gigantolaelaps gilmorei*, sp. n., and *Gigantolaelaps oudemansi*, sp. n.. This material was sent to Dr. H. de Beaurepaire Aragão, of the "Instituto Oswaldo Cruz" and was by him forwarded to us for examination, for which we are very grateful.

Gigantolaelaps oudemansi, sp. n., is the most characteristic of all forms in its genus; it is the only one, the ♀♀ of which bear, at the anterior margin of the sternal plate, between the two long pairs of setae, which are peculiar to the group under consideration, three more setae of much smaller dimensions. This fact, which is quite exceptional and unexpected, could only be considered, at first sight, as sufficiently characteristic for the establishment of a new genus if it were not that these three setae are of an entirely different aspect from that of the sternal setae; this characteristic is evidence of secondary and recent acquisition, which cannot have the same value as it would, if there were setae of the same type as the six sternal ones, which are customary in the group. In this case their primary significance would be demonstrated and would call for the creation of a distinct group.

The general aspect and the other generic characteristics, which are in accordance with those of *Gigantolaelaps*, are, however, sufficient reason to retain the species under consideration in this genus.

The only fact which strikes for attention about the *habitat* is that it is a parasite species especialized on rodents.

It is a species of rapid and swift movements, which lives, after been taken of from hosts, at least 48 hours in test-tubes.

The female are larviparous, the larves observed during 24 hours having not undergone any molt.

Description of the ♀

Idiosoma

The idiosoma of the holotype ♀ is somewhat flattened by the compression of the mounting and measures 1486 μ in length and 1105 μ in breadth to the level of the fourth pair of legs. It is, therefore, a relatively small species for the genus and rather wide, this, doubtless, being partly due to the compression; but its breadth, perhaps, should not exceed 1050 μ in well preserved specimens. The chitinization is relatively weak for the genus.

Ventral side.

Sternal plate quadrilateral, with pronounced angular prolongations of reticulated and very finely pointed surface. The thickness of the margins, which is so frequent in all other species of the genus, does not exist at the anterior

and posterior margins, and is only slightly pronounced at the lateral margins. In front, at the level of the anterior corners, its length is 292 μ and 370 μ at the level of the posterior corners. Including the anterior projection, the length at the median line is 235 μ. The anterior projection of the sternal plate is very characteristic in the South American species of this genus. The setae of the anterior pair are implanted at the lateral margins of this projection. In the species which we are now describing, this projection is 27 μ in length and 148 μ in breadth and has a pre-sternal plate immediately in front. The lateral margins are concave and rather thick, and the posterior is a little depressed in the centre. The usual setae of the sternal plate have the aspect which is peculiar to the genus: very wide and long; the anterior pair measures 228 μ in length with a greater width near the base of 15 μ; this pair like the others of the chitinized ventral zones comes out with a smaller breadth than the maximum, becoming narrower afterwards to terminate in a sharp point, implanted in the extremities of the anterior prolongation of the sternal plate already referred to. The middle pair is 235 μ in length, implanted a little inside the lateral margins, nearer to the anterior margin than to the posterior. The posterior pair measures 260 μ, being implanted a little inside to the back of the posterior corners.

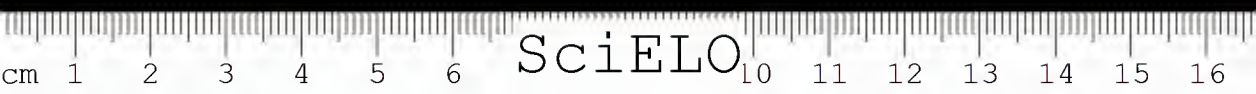
As it has already been pointed out this species presents, besides the six usual sternal setae, three other setae of smaller size, that is, 95 μ in length; the unpaired one is implanted in the median line on the same level as the normal anterior pair, just in the projection of the anterior margin of the plate; the paired ones are more or less equidistant from the median and from the anterior lateral, on a more posterior level, which would be equal to the level of the anterior margin of the plate, if the anterior prolongation did not exist; the space between the small paired setae is of 50 μ and that between the antero-lateral is 102 μ.

In some of the specimens of lot 1168, however, there are two secondary median setae, placed side by side at the median line, or one behing the other.

The *pre-sternal plate* lies immediately in front of the sternal and it even seems as if the anterior prolongation of the latter goes over its posterior margin, which is much less chitinized, being prolonged up to the point of origin of the tritosternum. Its surface is reticulated.

The *metasternalia* are long and narrow, going from the posterior margin of the sternal plate up to nearly the middle of coxa IV and having on the same level of the space between the coxae III and IV a long seta, much like those of the sternal plate, and measuring 225 μ in length.

The *tritosternum* is wide and long, and filamentous from the point of bifurcation, reaching the *corniculi maxillaris*.

Genital plate: — This plate, in the South American species of the genus *Gigantolaelaps*, is always short and only slightly inflated posteriorly, this latter

characteristic culminating in the species under consideration, in which the dilatation is hardly noticeable, the plate measuring 133 µ in width immediately in front of the genital setae, its narrowest point, and 144 µ at the level of the most dilated point of the posterior zone. The genital setae have the same appearance as the sternal and measure 182 µ. Apart from a lighter fork-like mark there is no other sculpture on the plate which shows very fine punctation . The length of the plate up to and including the *epigynum* is about 400 µ.

Anal plate: — This is 373 µ from the genital plate and is about 155 µ in length (it is difficult to measure, as the plate accompanies the curvature of the posterior extremity of the body), 180 µ in breadth, the anus measuring 60 µ and being 30 µ from the anterior margin. The surface of the plate is reticulated with the lateral corners more chitinized, as is frequent in the genus. The zone of the *cribrum* does not reach the level of the anus. The paired setae measure 160 µ and are equidistant from the middle of the anus and from its posterior pole, much nearer to the margin of the anal opening, than the margin of the plate. The posterior seta measures 240 µ and is a little wider and more flexible than the paired.

Inguinalia — Small, with setae 60 µ in length, and narrow, measuring about 22 µ in width.

Estigmata — On the level of the space between the coxae III and IV. Tube of the peritrema visible up to the coxa II running along the ventral side and long on the margin. *Peritrematalia* very slightly developed posteriorly and only very little chitinized, visible up to the coxa I. On the uncovered ventral side there are about five pairs of setae between the genital and the anal plate and a hundred of setae scattered over the rest of this surface, excepting the antero-lateral zone, which is bare.

Dorsal side: — It is partially covered by the dorsal shield, formed by a comparatively narrow plate, which is short and of weak chitinized, excepting the marginal anterior zone up to the height of the posterior margin of the first pair of coxae, where the chitinization is stronger. The surface of the shield has a narrower reticulation than that shown in Fig. 2, the only sculpture shown being represented by finely pointed areas, in the middle zone. The dorsal shield measures 1288 µ in length by 735 µ at the level of the coxae IV where it has the greatest width. At its anterior extremity it is very pointed and projecting forwards; as it is the rule in South American species of the genus, it has three pairs of setae: the first, pointing forwards horizontally, measures µ68; the second, which is vertical and, therefore, difficult to measure, is about 110 µ; the third, which is wider and more flexible, points backwards and mea-
projecting forwards; as it is the rule in South-American species of the genus,
sures 220 µ. Besides these setae, there are still eleven pairs of submedian setae, the fourth being the most distant from the middle line and the ninth the nearest,

decreasing in length from the first to the ninth pair (1st pair = 182 μ; 2nd pair = 159 μ; 3rd, 4th, 5th = 144 μ; 6th pair = 136 μ; 7th and 8th = 128 μ; 9th = 113 μ and 10th pair = 60 μ only; the 11th or postero-median pair of the shield becomes long again, measuring 166 μ. In addition to these there are about 15 marginal setae on each side and some 10 on each side between these and the submarginal. All the setae of this species are smooth both on the dorsal and ventral sides and on the legs, there being no barb as is frequent in the genus *Laelaps*. Apart from the usual pair of anterior pores, which is situated in the anterior projection, the dorsal shield has also some pairs of slits and some circular marks.

Legs — Stout and setous with only one spine, the posterior of coxa III. The IV pair of the legs is the longest, measuring about 1350 μ, and the II pair the shortest, measuring only 920 μ; the length of pairs I and III is 1050 μ. The coxa I has two setae, the distal being the larger and the thinner with 120 μ, and the proxinal with only 95 μ. Basifemur I wide, with 138 μ at its widest point, with two long distal and dorsal setae, of which the larger, which is more distal, measures 280 μ and the smaller 115 μ. Telofemur I enlarged, with 150 μ at its greatest breadth, with four long setae, of which the largest, which is the most proximal, measures 266 μ and the smallest, the most distal, 115 μ: apart from these, there are other short setae. The tarsus bears setae which are thin and short as compared to the similar ones of the other legs, and an apical area, which is covered with short hairs. *Pulvillus* very developed and with weak claws compared with the other legs.

Leg II very enlarged, the greatest length of the telofemur being 190 μ. Coxa II with two setae, of which the anterior, smaller, is curved the posterior measuring 175 μ; this is an exception, however, for in all South American species of the genus it is as a rule very long, excepting in this case and in *Gigantolaelaps brachyspinosus* FONSECA. The remaining segments are setous, but without spines, the tarsus ending with *pulvillus* and two strong claws, which are curved at a right angle. Coxa III with a curved anterior seta and a posterior spine, the only one worthy of this name in the species which we describe, for it measures 60 μ in length by 12 μ in breadth at the base. The remaining segments of leg III are setous, principally the tarsus, where are spine-like setae, which are stronger than in the other legs; strong claws, which are curved in a right angle.

Coxa IV with median, short and weak setae. Other segments with fine and long setae.

Gnathosoma

Palps — With 320 μ from the 1st to the 5th joint. The first joint has only two central setae, which are relatively long. The seta of the 4th joint is

bifid, apical and internal, as in all species of *Laelaptidae.* The formula of the joints is 1,2(3,4),5.

Maxillicoxae externally rounded, with setae of 95 μ. Anterior setae of the hypostoma 75 μ ; posterior external 80 μ and postero-internal, which are very long, 138 μ.

Corniculi heavily chitinized.

Rima hypopharyngis with various series of 2 or 3 denticles.

Epistoma membranous with rugged edges, prolonged into a point in front.

Labrum triangular, long, reaching the distal extremity of the 2nd joint of the palps, becoming gradually sharper, ending in a point, pilous at the edges.

Paralabra wide, membranous, rounded.

Malae internae, membranous, filamentous, flexible, pilous.

Styli in form of curved stems.

Powerful *mandibulae,* measuring 304 µ from the extremity which is near the genual up to the apex, 70 µ broad at the genual. *Pulvillus* with a crown of setae. Hair at the base of the *digitus fixus. Digitus mobilis* 102 μ with two equal teeth. *Digitus fixus* with three teeth placed farther forwards than those of the *digitus mobilis,* of which the posterior is the greatest and the middle one the smallest; *pilus dentilis* 15 μ long.

Larve

The larve was found in the lot 1168, caught by the author, who obtained it by preserving the numerous ♀♀ collected (♂♂ were not found nor in this lot neither in others) in test-tubes. After a few hours, various larves were born, which did not present any moult after 24 hours, therefore being mounted for description.

Larves of large sizes, the idiosoma measuring 995 μ by 645 μ in width, at the level of the third pair of legs. The larve measures 1380 μ up to the apex of the palps.

Ventral side — Due to the weak chitinization the larve does not present plates yet, not even the anal plate. In the propodosoma are two setae about 120 µ in length: the anterior at the height of the space between the coxae I and II with more approximated setae; the posterior at the level of the posterior margin of the coxa II with setae, which are more distant from the median line, being 150 μ distant one from the other. These two pairs seem to correspond to the anterior and the posterior pair of the sternal plate of the adult, having been seen no traces of the median pair, nor of the secondary median setae of the

anterior margin of the sternal plate. At the height of the coxa III is another pair of setae of similar size, correnponding to the metasternal pair. In the region, which in the adult corresponds to the pair of genital setae, there is the smallest pair of setae of the larve, in the ventral side, measuring only 46 μ, being 75 μ distant one from another, therefore very approximated. Immediately behind this pair there are two other longer setae, of 80 μ, situated at the same distance one from another. There is another pair of setae somewhat to the back and outwards, measuring 106 μ in length. More outwards and to the back are other pairs of setae which are somewhat larger. Finally at the posterior extremity, there are two pairs of setae, which are extremely long; a sub-median. 405 μ and another of the same length, somewhat outwards.

The anus is marginated by three setae: two lateral paired, which are very long, 230 μ in length, and one posterior unpaired of 290 μ. There are no traces of chitinization of the anal zone.

The stigmata seem to be represented by a marginal and refractive zone. situated much behind the third pair of legs. The peritrema was not seen.

Dorsal side — Zones of heavier chitinization at the dorsal side could not be seen in the two specimens examined. The anterior zone of the dorsal side presents. apart from the pair of vertical setae, five other pairs in the median zone, the first and the third being the most approximated and the fourth the most distant from the median line; there are, apart from these, four pairs of sub-marginal setae. At the posterior extremity of the opisthosoma, there are four pairs of long setae, the longest measuring 380 μ.

Gnathosoma — Epistoma in shape of a band which is broader in the centre, with sharp pointed extremities and smooth free edges. Mandibulae with fixed and moveable fingers, each seeming to present a little tooth. Setae have not been seen at the base of the fingers. *Labrum*: lanceolated slightly filamentous. *Maxillicoxae* with fractured *setae maxillicoxae*, having only one of the *anterior* and one of the *posterior*. *Corniculi* relatively well chitinized. *Rima hypopharyngis* with slightly toothed edges. *Tritosternum* with fine hairs beginning near the point of bifurcation. Palps with smaller hairs in the fifth and a bifid seta in the fourth joint.

Legs — From three pairs, the second is the shortest. Each of the coxae presents two setae, being the posterior seta of coxa II the largest.

Holotype ♀ No. 1013 in the collection of the Instituto Butantan, caught. together with the numerous ♀ ♀ specimens of the lot No. 914, on field-rats of undetermined species, by R. M. Gilmore, on 7-10-936, in Annapolis. State of Goyaz. Metatypes and topotypes captured by the same collector in lots: No. 910, living as parasites on "*Sylvagus* ♂"; Nos. 912 and 915 on rat of

undetermined species; No. 970, on *Echimys*, sp. together with *Gigantolaelaps gilmorei*, sp. n.. ♂ and young specimens unknown.

Metatypes and larves of lot 1168, caught by the author on a wild rat, *Nectomys squamipes* BRANTS, No. 1521 of the register of the Section of Parasitology, Instituto Butantan, in the forest of the "Serra da Cantareira". São Paulo, on 23-9-37.

The name of the species is dedicated to the well-known acarologist A. C. Oudemans, to whom this branch of zoölogy owes so much, and who is at present publishing an exhaustive and erudite critical work, revising this group, destined to become classic.

III

Gigantolaelaps gilmorei, sp. n.

This species belongs to the number of those which were caught on wild rodents by Mr. R. M. Gilmore, in Annapolis, State of Goyaz, whilst studying jungle yellow fever. We possess two lots of this species: the type lot No. 913 in the Instituto Butantan collection, caught on "rats" (No. 1527 of Gilmore, also parasited by *Gigantolaelaps oudemansi*, sp. n.) and lot No. 951, caught on *Echimys* sp. (No. 1063 of Gilmore). It is one of the largest species of the genus, differing from the remaining species by the smaller enlargement of the femora of leg I. The chitinization is median.

Description of the ♀

Idiosoma

Very large species, the idiosoma of which is 2024 μ long in the holotype, the length being 2630 μ to the apex of the palps. The width at the level of the IV pair of the coxae is 1320 μ. The general shape is more elliptical than ovoid, although the anterior extremity is more pointed.

Ventral side.

Sternal plate of reticulated and pointed surface, with angular prolongations, which are slightly pronounced at the back, measuring at the anterior margin 430 μ in width and the posterior 570 μ. The length at the median line is 300 μ, including the median projection. This projection is not very pronounced, measuring only 38 μ by 250 μ in width; the chitinization is equal to that of the plate, clearly distinguished, however, from the pre-sternal, which immediately follows it. Of the margins only on the lateral, which are concave, there is a slight thickness. The posterior margin is slightly concave at the central part,

being encircled by a less chitinized zone, which also exists around the lateral margins, where, however, it is toothed. The anterior setae of the plate reach the posterior margin, measuring 236 μ by 19 μ at the greatest breadth, at some distance from the base and being planted at the level of the external angle of the anterior projection of the plate, and 174 μ one from another. Median pair nearer the anterior angle than the posterior of the plate, implanted a little within the lateral margin, measuring 334 μ and extending beyond the middle of coxa III. Posterior setae removed from the posterior angle, measuring 350 μ, very sharply pointed towards the distal extremity as all the long setae of this species and nearly reaching the middle of the coxa IV. Anterior transversal pores large, situated behind the anterior setae; posterior pores oblique, behind and inside of the median setae.

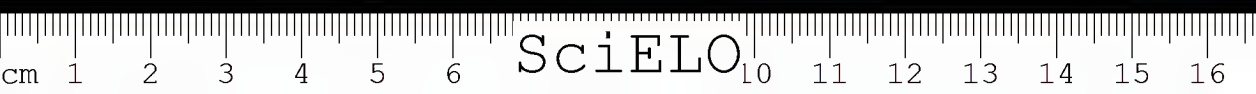
Pre-sternal of easy chitinization, beginning immediately in front of the sternal and extending to the base of the tritosternum, with grooved surface.

Metasternalia elongated, accompanying the internal margin of coxae III and IV and measuring 342 μ.

Tritosternum wide at base where it measures 60 μ in width, pilous beginning a little after the origin of the *lasciniae*, measuring 470 μ from the base to the apex and reaching the base of the *corniculi*.

Genito-ventral plate — Plate of weaker chitinization than the sternal plate, elongated and very slightly dilated posteriorly, not exceeding the greatest breadth of the ventral part that of the genital part, maximum width 220 μ. The length is about 644 μ; the greatest width is 166 μ directly behind the pair of genital setae. The surface is punctuated and has a very slight reticulation. The genital setae, similar to the sternal, measure 288 μ.The sculpture of the genito-ventral is represented by two series of clear divergent marks, which begin in the submedian region, directly behind the genital setae and go back — and outwards.

Anal plate — It is at 380 μ from the posterior margin of the genito-ventral in the holotype, reaching 760 μ in a pregnant specimen. The length is difficult to measure owing to the incurvation of the posterior extremity of the opisthosoma which the plate accompanies; it may be about 266 μ in length. The maximum breadth is 258 μ at the anterior margin of the holotype, measuring 288 μ in another specimen. The anus is about 38 μ from the anterior margin. The shape of the plate is triangular and the surface reticulated, with external margin and angles darker. The anterior margin is slightly concave in the centre. The paired setae lie more or less at the level of the posterior pole of the anus, measuring about 212 μ; the paired setae measure about 380 μ, reaching the *cribrum* more or less at its point of emergence.

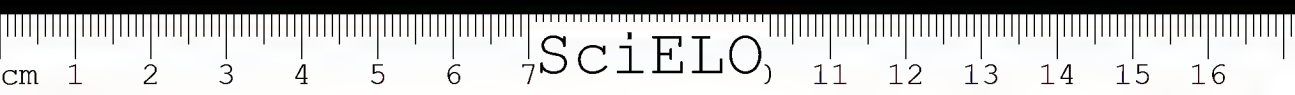
Inguinalia elongated, of about 76 μ.

Stigmata situated at the level of the space between the coxae III and IV. Peritremata visible in wide extension, accompanied by *peritrematalia* very developed anteriorly; this plate terminates at the level of the stigmata, the posterior prolongation not having been seen. Uncovered ventral zone densily covered with long and fine setae, which become fewer in the lateral parts and near the anal plate.

Dorsal side.

Dorsal shield — Covering nearly the whole idiosoma, leaving only free a stripe around the lateral and posterior margins. It measures 1940 μ in length by 1160 μ at the greatest width. Its anterior extremity ends in a point, the posterior being wide and convex. The lateral margins are undulated anteriorly, being parallel and straight in the median zone. The impression of heavy chitinization of the anterior portion of the lateral margins is, to a considerable extend, produced by the strong chitinization of the peritrematalia, seen by transparency. The surface of the shield has fine reticulation and very extensive sculpture; this goes from the anterior extremity up to the posterior limit, being, however, more pronounced in the anterior half. The sharp pointed anterior zone of the shield has the three usual pairs of setae: an anterior, projected towards the front; a vertical, shorter; and a longer going backwards. The anterior remaining setae of the shield measure about 185 to 220 μ and those of the posterior zone about 150 μ, excepting the submedian pair, which is near the posterior extremity, which measures 88 μ and the posterior terminal, which is about 200 in length. Apart from the group of three anterior pairs there are 11 submedian pairs, of which the 5th, 6th and 10th are the nearest and the 4th and 8th the farthest from the median line. Various pairs of circular marks are moreover seen on the surface of the shield, as also a pair of anterior pores, in form of a slit. The lateral uncovered surface of the dorsal face has numerous setae. All the setae are smooth in this species.

Legs

In examining the legs attention is called to the fact that the femora of leg I are not so dilated as in other species of the genus; there are no tuberosities in these segments. Another characteristic of the species is that the legs II are not so elongated as might have been expected from their size. The spine of coxa III is the only one which occurs.

Leg I is the second in length. The coxa I has two setae, the distal being the finest, of 220 μ and the proximal of 170 μ. The telofemur I measures only 170 μ in width and has two setae, of which one only about 170 μ and the other about 230 μ, apart from other short ones; there are no tuberosities. The basifemur has a long seta of approximately 258 μ, also without tuberosity. Tarsus with fine setae.

Leg II somewhat elongated, the basifemur measuring 220 μ in width. Coxa II with two setae of which the posterior (its long size is characteristic in the genus) measures 236 μ. The tarsus has spine-like long setae, which are stronger than those of the other legs, ending in *pulvillus* and claws equal to those of legs III and IV and stronger than those of leg I.

Leg III with posterior spine in the coxa, about 100 μ in length by about 22 μ, its greatest width at the base.

Leg IV is the longest, the coxa having only one seta, the length of the erect setae of the tarsus being noticeable; they may reach 260 μ.

Gnathosoma

The gnathosoma measures 880 μ from the base to the apex of the palps, a minute examination only having been possible after dissection of a specimen of lot 951.

Palps 530 μ, the first joint having a ventral setae of nearly 150 μ. The 5th joint is long, measuring 80 μ.

Maxillicoxae with setae *hypostomatis internae* all of large development, measuring respectively 142, 224, 142 and 135 μ.

Corniculi maxillaris well chitinized, with sharp point.

Labrum pilous, gradually pointed towards the distal extremity, ending in a not very sharp point, covered by a structure of equal aspect and conformation.

Malae internae maxillarum pilous, straight, contiguous, median, ending in a sharp point and without hairs.

Styli membranous, slightly curved, of canaliculated aspect, reaching the apex of the *corniculi*.

Mandibulae strong, with two teeth (the posterior larger) in the *digitus mobilis* and three in the *digitus fixus* (the middle one smaller and the posterior larger), which has a *pilus dentilis* not dilated; at the base of the *digitus fixus* a short hair and in that of the *digitus mobilis* a crown of setae with a globose formation, transparent in the middle. On the internal surface of the *digitus fixus* also a lamellar formation may be seen, of membranous aspect.

Description of the male

Amongst the material caught by Dr. Gilmore we received a lot, N.° 1068, caught on *Echimys sp.*, in Annapolis, State of Goyaz; it contained two species: *G. oudemansi*, sp. n. and *G. gilmorei*, sp. n. The ♀♀ predominated in the material, existing in large number, but there were no young forms; a male

specimen was also found, however. It is not easy to decide if the ♂ encountered. belongs to *G. oudemansi*, sp. n., or to *G. gilmorei*, sp. n. However, we are inclined to prefer the second hypothesis not only because the specimen in question is large in size, bigger than the ♀ ♀ of *G. oudemansi*, but also due to the non-existence of the three small setae of the anterior margin of the sternal, characteristic of this species. The latter characteristic should not, however, be considered decisive, for the hypothesis of the non-existence of three setae in *G. oudemansi* ♂ ♂ cannot *a priori* be excluded, for the reason that it is precisely in this zone, that the male sexual organ is found, a fact which in itself alone would justify such morphologic variation. The large dimensions of the specimen and some other morphologic details, such as the sculpture of the shield of idiosoma, the lack of enlargement and the non-existence of tubercles in the femur I, speak in favour of its identification with *Gigantolaelaps gilmorei*, a species with which we are tentatively identifying the ♂ found.

Idiosoma

Allotype specimen in shape almost elliptical, only somewhat more pointed at the anterior extremity, with slightly pronounced shoulders. Idiosoma with weaker chitinization, of large dimensions, measuring 1760 μ in length by 1175 μ at the widest point at the level of the IV pair of legs.

Ventral side

Tritosternum wide at the base, 340 μ in length and slightly pilous *laciniae*.

Ventral plates fused, weakly chitinized, with reticulation throughout the whole extension, narrower mashes in the ventral zone. Anterior margin of the sternal plate slightly prominent, the genitalia opening therein, continuing with a pre-sternal mo e slightly chitinized which goes up to the tritosternum. Prominent antero-external angles, forming a prolongation between the coxae I and II. Posterior angles of the sternal somewhat projected. Lateral margins of the sternal thickened, as also those of the metasternal zone. Ventral zone very enlarged, its margins having various groovings. Anterior sternal setae 175 μ, median and posterior setae somewhat stronger and 208 μ long. Metasternal setae of 152 μ and genital of 148 μ. The surface of the ventral zone is covered with about 150 fine setae of 90 to 110 μ in length. The *anal plate* is differentiated by the wider reticulation, similar in form to that found in the ♀. The paired setae of this plate measure 140 μ and the unpaired 245 μ. The inguinal plates are enclosed in the ventral plate, which is extremely wide in front, becoming gradually narrower towards the back, the inguinalia appearing in the form of clearer zones a little irregular in shape.

Stigmata at the level of the space between the coxae III and IV.

Peritrema of short tube, ending at the level of the posterior margin of coxa II.

Peritrematalia prolonging anteriorly up to the anterior extremity of the idiosoma, wider between the coxae II and III and heavily chitinized anteriorly. Behind the stigma they seem to be interrupted to a certain extent, appearing afterwards to encircle the coxa IV up to the ventral side; the ♀♀ in the species of this genus also seem to have this aspect.

Dorsal side

Shield of idiosoma relatively slightly chitinized, with regular margins, slightly pronounced incurvation at the level of the shoulders, posterior extremity wide and fairly rounded, and anterior very sharply pointed. The margins seem to be more chitinized up to the level of coxa II as the *peritrematalia* appear by transparency. The anterior extremity of the shield has a pair of anterior setae of 120 μ, a median pair of only about 70 μ and a posterior of 200 μ. Apart from these there are another 12 pairs of setae of the middle line, of which the 7th is the farthest away, the 2nd the longest, measuring 215 μ and the 11th the shortest, 68 μ long. The posterior pair measures 195 μ. The surface of the shield is reticulated, and has many circular symmetric marks, of varying size and sculpture very similar to that of the ♀.

Legs

The leg IV is the longest, measuring about 1760 μ and the second the shortest, about 1350 μ. Coxae without spines and with setae only; of these the posterior of the coxa II is the longest, measuring 160 μ; it is, however, much smaller than the usual size in the ♀♀ of the South American species; the seta of the coxa IV is noteworthy, apart from its small dimensions, as it only measures 60 μ, for the fact that it is implanted much farther forwards than is the rule in *Laelaptidae*.

The femora of leg I are not enlarged and have no tuberosities, agreeing in this with the ♀♀; the basifemur has two and the telofemur one longer seta, which measure respectively about 135 μ and 150 μ; they are, however, much smaller than those of the ♀. Tibia and tarsus of leg I with fine hairs.

Basifemur II with two very strong and short spines at the ventral side; telofemur II with a weaker spine than those of the basifemur; genual with one spine; pretarsus with two very strong spines.

The other two legs have only setae which are larger and finer in the tarsus IV.

All the legs have sculpture with light marks in the various joints.

This species is dedicated to Dr. R. M. Gilmore, of the Rockefeller Foundation, who in Annapolis, Goyaz, caught abundant material of rat mites, a part of which forms the object of the present work. Allotype No. 1033 in the collection of the Instituto Butantan.

Gnathosoma

Measures 735 μ from the base of the *maxillicoxae* to the apex of the palps.

Palps fine, the IV joint being more setous, with a long and strong ventral seta in the joint I.

Maxillicoxae with the usual setae, the anterior being the longest.

Corniculi very weakly chitinized and extraordinarily elongated.

Rima hypopharyngis with about seven rows of small denticles.

Epistoma membranous, wide at the base and pointed in the apex.

Labrum triangular, long, gradually pointed, longitudinally grooved, with very short hairs, nearly reaching the apex of the second joint of the palps.

Mallae internae long, longitudinally grooved.

Mandibulae fine, long, reaching the apex of the second joint of the palps, when withdrawn. *Digitus fixus* very long, of 480 μ, with rounded end, convergent, heavily chitinized, seeming to have an apical orifice. Near its base is inserted an elongated membranous formation, pointed towards the extremity. A more minute description was not possible owing to the retraction of the mandibulae and to the fact that the description was based on an entire specimen.

Gigantolaelaps vitzthumi, sp. n,

This is the type species of the genus.

This species is notable for its extraordinary size, which surpasses even those of *Gigantolaelaps gilmorei*, sp. n., as it reaches 2580 μ in length up to the apex of the palps, being, therefore, the largest parasite known in this group.

Apart from its size in which it approaches certain other species, the specialist will be surprised at the deep colouring, which is dark brown, and which can be seen in preparations, cleared by Berlese's mounting fluid, with black points in the zones of strongest chitinization; seen with the naked eye, the colouring is even darker, especially at the propodosoma, owing to the existence of the sternal chitinization.

Of this species, caught by Mr. Blaser on wild rats in the Minas Geraes and Goyaz boundary, we only have ♀♀, the ♂ and young forms being unknown.

Idiosoma

Very large, 2050 μ in length, very broad in front, becoming narrower towards the back, the greatest breadth being 1560 μ at the level of the IV pair of legs. The sudden front widening is not the cause of a prominence of the shoulders.

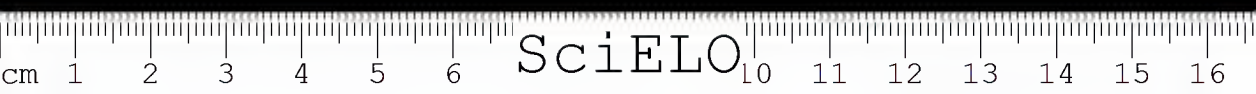
Ventral side

Sternal plate very heavily chitinized, as in *Laelaps sculpturatus* Vitzthum according to the excellent description of this acarologist: surface reticulated, with anterior projection so pronounced, that it goes to the base of the tritosternum, to a distance of 118 μ; of the weak chitinization of the pre-sternal plate all that is noticeable is a narrow raised stripe around this projection. It seems certain to us that this projection forms an integral part of the sternal plate and does not represent the result of the chitinization and fusion of the pre-sternal with the sternal, as it is in it that the pair of anterior sternal setae is implanted, the anterior pair of the *pori repugnatorii* being exactly at the limit of its base. Of the borders of the sternal plate the lateral and the posterior, principally the latter, are thick, this thickness being of 55 μ in breadth at the posterior margin. The anterior angles have long projections between the coxae I and II, the posterior being much less pronounced. The sternal setae are very long, strong and only slightly flexible, the anterior pair measuring 347 μ, the middle one 408 μ and the posterior 370. The plate with 382 μ in length measures 205 μ, in width at the level of the anterior prolongation 382 μ immediately behind this and 558 at the level of the posterior angles.

Metasternalia elongated, less chitinized, raised, with seta of 347 μ in length at the level of the space between the coxae III and IV.

Tritosternum 355 μ in length, bifid, with *lasciniae* which are pilous from the point of emergence.

Genito-ventral plate slightly expanded posteriorly, measuring 642 μ in length, being widest posteriorly, 284 μ, and narrowest directly behind the genital setae, 235 μ. The surface presents wide reticulation and some sculpture at the genital zone; the genital setae pair measures 296 μ in length. As in all the other South American species of this genus, there are no setae inserted at the ventral edge of this plate, but it so happens in this as in other species, that this edge is depressed by the setae of the uncovered ventral zone, which are inserted nearer the plate; in the present case there are five setae which depress the border in this region, one of those of the median pair lying sufficiently far away so as not leave any impression on the plate.

The *anal plate* 460 μ distant from the posterior edge of the genito-ventral plate, of triangular form with rounded corners, with anus of 83 μ in length, at 53 μ from the anterior margin. The anterior edge of the plate is slightly concave and the lateral ones are slightly convex; surface reticulated. Paired setae at the level of the middle of the anus with 244 μ in a cotype, and 290, in a paratype; the unpaired seta, broken in the cotypes, measured in the same paratype 355 μ in length. The *cribrum* reaches at the sides the level of the posterior seta. There

are about a hundred setae scattered over the uncovered ventral surface of the plate, varying in length between 150 and 225 μ

Inguinalia small, elongated, of a comparatively weak chitinization.

Stigmata at the level of the space between the coxae III and IV.

Peritrema with a visible tube up to more or less the level of the anterior margin of the coxae II.

Peritrematalia practically without posterior chitinization behind the stigmata, larger in the space between the coxae II and III and very heavily chitinized from the coxa II onwards, where it constitutes a dorsal plate which unites with the anterior zone of the dorsal shield, forming one of the points of heaviest chitinization of the body.

Dorsal side

Shield of idiosoma heavily chitinized, not covering the whole body, leaving a wide lateral and posterior margin uncovered, narrower at the extremities, principally at the anterior, which is sharp and pronounced, as in the other species of the genus. This shield measures 1910 μ in lenght by 1264 μ in breadth at the level of the IV pair of legs. Its surface is all marked by a reticulation of narrow mashes. The sculpture is abundant in the anterior part and rare in the posterior, having a large clear central mark directly behind the anterior end of the shield. The margins are regular and the shoulder-blades only slight pronounced. The submedian pairs of setae are more or less 14 in number, including the three pairs of the anterior projection; these have the usual aspect: anterior, of median dimensions, pointed forwards; median, small, vertical; and posterior, very long, 350 μ in length. Of the remaining submedian pairs that which is directly after the above mentioned long seta of anterior extremity and the last of the posterior extremity, are the longest, measuring about 280 μ; the smallest is the penultimate which measures only 88 μ, being, therefore, as in the other species of the genus, by far the smallest seta of the dorsal shield. There are still about 15 marginal setae on each side of the dorsal shield and others between these and the submedians. Circular marks of symmetrical situation are numerous on the surface of the shield. The pair of anterior pores is scarcely visible, and seems to be at the level of the long pair of setae of the anterior projection of the shield.

All setae are smooth, in this as in the other species of the genus.

Legs

Legs long, the IV pair measuring 1760 μ, chitinized, stout, setous, with first and second pair enlarged.

Leg I strongly flexed, even in rest. Coxa I wide, with serration of sharp teeth at the anterior and posterior sides of the distal edge, much larger at

the latter. Proximal spine of the coxa, of median development, with 80 μ, implanted in tuberosity; distal seta 96 μ long. Femura enlarged, measuring up to 260 μ in width. The greatest seta of the basifemur measures 470 μ and the other long seta of the same joint 380 μ. There are also two setae in the telofemur, which are longer than the rest, the largest measuring about 380 μ. The setae of greater development are inserted in heavily chitinized tubercles, which give a rough aspect to the surface of the joints. There are also strong setae in the tibia; those of the tarsus, however, are weak, this joint terminating with claws and *pulvillus*.

Leg II much enlarged and also flexed to the ventral side. Coxa II with dorsal spine extremely wide, ending in a sharp point, making a projection at the anterior margin of the joint. Ventral posterior seta of coxa II measures 420 μ in length. With exception of the tarsus, which has 8 or 9 strong spines, the remaining covering is constituted by median setae.

Leg III not enlarged. Posterior spine of the coxa with 80 μ. Spines of tarsus longer and as strong as those of leg II.

Leg IV the longest, having only relatively weak and rigid setae in the tarsus. There is only one seta on the coxa.

The aspect of the legs of the ♀ lead us to expect a considerable enlargement of the legs of the ♂ which should have very strong spines, real spurs.

Description based on two cotypes ♀ ♀, one of which was dissected, mounted on slides, No. 1041 in the collection of the Instituto Butantan; paratypes No. 518 in the same collection. Male and young forms unknown.

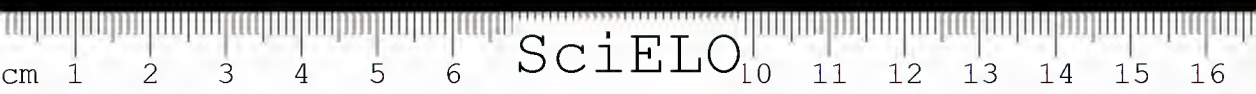
The species is dedicated to the great acarologist Count Hermann Vitzthum, to whom the author is grateful for important adise.

Gnathosoma

Owing to the withdrawal of the mandibulae and the exceptionally heavy chitinization, a specimen would have to be dissected for a minute examination of the parts of the gnathosoma, as was done in material of the typical lot.

Palps with first joint presenting a ventral ridge in which two comparatively long setae are implanted. 5th joint with sub-terminal group of seven hairs and one longer terminal, and other scattered ones.

Epistoma membranous, of broad base, sharp pointed in the apex, with some denticles in the sub-apical region of the margins.

Mandibulae — The joint which permits insertion to the fingers of the chelicerae measures 300 μ by 102 μ in breadth. The *digitus mobilis* 120 μ in length, has two pointed teeth separated by a space of 8 μ and distant from the apex 20 and 35 μ respectively. The *pulvillus* has a crown of setae of about 35 μ at the base of the joint. The *digitus fixus* measures about 90 μ and has three teeth.

being the proximal sharp pointed, the distal smaller than this and sub-apical; the tooth, which is situated between these two, is hardly visible and is at the side of the *pilus dentilis*. *Pilus dentilis* not dilated, with 35 μ. At the base of the *digitus fixus* is a hair, which is very wide at the base and rapidly pointed. A globose formation at the *pulvillus* and another laminated at the scissors of the mandibulae are clearly to be seen.

Labrum triangular, longitudinally grooved, pilous at the margins, and with little spines at the free extremity.

Malae internae in the form of two *lasciniae*, which are very pilous, reaching the apex of the *labrum*.

Stily in form of a stem, which is slightly curved inwards.

Paralabra membranous, broad with extremities, which are widely rounded.

Maxillicoxae with the usual setae, the *posteriors internae* measuring about 150 μ.

Rima hypopharyngis with 12 lines of two or three denticles, which are stronger than usual.

Corniculi only a little more heavily chitinized.

V

Gigantolaelaps goyanensis, sp. n.

This species is very similar to *Gigantolaelaps mattogrossensis* FONSECA, 1935, with which it was confused by us until we undertrook the generic revision, which we are now presenting, when a minute comparative study enabled us to discover differences which are sufficiently constant to distinguish the two species. This distinction is based principally on the aspect of the distal seta of coxa I, which in *Gigantolaelaps mattogrossensis* is narrower, gradually pointed, relatively flexible, ending with a sharp point, whilst in *G. goyanensis* it assumes the aspect of a spine, only a little smaller and weaker than that of the proximal one of the same joint, becoming a little pointed towards the extremity, which narrows suddenly ending in a point similar to that of the proximal spine. Another constant distinction is the length of the sternal plate, which varies between 360-400 μ in *G. goyanensis* and between 260 and 330 μ in *G. mattogrossensis*.

Gigantolaelaps goyanensis, sp. n. was identified by us from material collected: a) in Annapolis, State of Goyaz, by Mr. R. M. Gilmore, on *Estrimys* (?) *sp.* No 1043, on rats Nos. 3094, 3874, 3876, 3856, 3850 and on *Metachirops opossum* No. 3873; b) in Angra dos Reis, State of Rio de Janeiro, on "rato paca", Lauro Travassos leg.; c) in Manguinhos, Federal District, Rio de Janeiro, on *Nectomys*

squamipes, Fabio Werneck leg.; d) in the Minas Geraes - Goyaz boundary on field rats, Blaser capt..

This abundant material consists almost exclusively of ♀♀, only one ♂ specimen having been found, selected for allotype amongst the material sent by Dr. Fabio Werneck. The young forms are unknown.

DESCRIPTION OF THE ♀

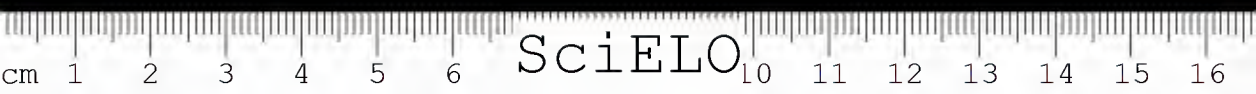
Species large, 2200 μ in length up to the apex of the palps, heavily chitinized, body wider at the level of the III pair, becoming narrower towards the back, very pilous, with some setae, which are very long.

Idiosoma

1850 μ in length by 1293 μ in breadth at the level of the IV pair and 1323 μ at the level of the III pair of legs, pointed towards the front from the anterior margin of the II pair; of setous aspect.

Ventral side

Sternal plate heavily chitinized, visible under the form of a dark spot, when seen with the naked eye in cleared preparations. Margins thick, principally the lateral, which are slightly concave, and the posterior, which is convex and frequently forms two submedian posterior extensions. Anterior margin with a strong median projection, which occupies the whole pre-sternal zone, reaching the tritosternum, the base of which is even covered in part by the anterior edge of the projection. The antero-lateral angles are the most prominent. The surface of the plate is all reticulated, the chitinization of the pre-sternal zone being somewhat lighter. The plate measures 370 μ in breadth at the level of the anterior margin and 430 μ at the level of the posterior, the length being 378 μ in the holotype, varying between 360 and 400 μ in other specimens measured, permitting distinction with *Gigantolaelaps mattogrossensis* in which it is smaller, as has been pointed out. Of the setae the anterior, which are implanted in the anterior zone of the plate, measure 318 μ, the middle ones 370 μ and the posterior 340 μ; they are flexible and become gradually sharper, ending in an extremely fine point, as in the other species of the genus. The anterior sternal projection measures 110 μ in length by about 350 μ in breadth at the base. The pores have the usual situation and shape.

The only indication of the pre-sternal is found in a margin which surrounds the anterior projection of the sternal plate.

Metasternalia with a more chitinized zone at the level of the space between the coxae III and IV and posterior and anterior prolongations, the latter more developed, along the margins of those coxae. Metasternal setae identical in appearence with the sternal, measuring 340 μ in length.

Tritosternum wide at the base, with pilous *lasciniae* from the point of bifurcation, reaching the level of the posterior setae of the hypostoma.

Genito-ventral with about 580 μ in length up to the *epigynum* of median chitinization, somewhat expanded posteriorly, measuring 260 μ in the maximum width and 220 μ at the level of the genital setae. Wide reticulation in the posterior zone and sculpture represented by a group of six lighter marks, three on each side, contiguous, at the level of the genital setae. Genital setae 267 μ in length. At the level of the posterior margin are depressions corresponding to the three pairs of setae of the exposed surface which are implanted nearer the plate, only one of these however, the more anterior, touching it in the holotype.

Anal plate separated from the genito-ventral by a space of 400 μ in the holotype. Triangular, surface reticulated, darker in the anterior corners, anterior margin more or less straight in the centre and anterior corners rounded; greatest width of the anal plate 207 μ, the length being impossible to measure in the holotype, as the plate accompanies the inclination of the posterior margin of the idiosoma. The unpaired seta measures about 222 μ and the paired about 148 μ. The anus lies at about 45 μ from the anterior margin.

Inguinalia. Inguinal plates more or less triangular, measuring about 90 μ, well chitinized.

Stigmata at the level of the space between the coxae III and IV.

Peritremata visible up to coxa III; they cannot be followed farther, owing to the heavy chitinization.

Peritrematalia without posterior prolongations, heavily chitinized principally in the front, going to the dorsal side at the level of the point in which the idiosoma becomes suddenly narrower, in the space between the coxae I and II, visible up to the anterior extremity of the dorsal shield. In the uncovered zone of the ventral side, there are about 180 rigid setae, 125 to 200 μ in length, rarer around the anal plate and at the side of the *peritrematalia*.

Dorsal side

Shield of the idiosoma of very regular outline, but very pointed at the anterior extremity, where the chitinization reaches the maximum verifiable in the body, with posterior extremity straight ended. Its length is 1715 μ with the width of 1039 μ at the level of the IV pair of coxae. Sculpture abundant, the heavy anterior chitinization being an especial contrast. The submedian setae are arranged in 11 pairs, apart from the group of three pairs of the anterior extremity; this was verified in a paratype as the majority of the setae of the holo-

type were broken. The pair of posterior submedian setae of the shield measures 244 μ in length and that of the small submedian setae, which are immediately in front of this, only measures 66 μ. Circular marks are frequent on the shield.

Legs

Legs I and II enlarged.

Leg I — Coxa with a proximal stout spine, measuring about 80 μ in length by 18 μ in width at the base and a distal rigid spine, a little smaller and finer and of equal shape to the proximal, in this differing clearly from *Gigantolaelaps mattogrossensis*, where the distal spine is substituted by a spine-like seta, which is pointed and flexible. Distal margin of coxa I with denticles at the anterior and posterior edges, being larger in the latter. Basifemur I with two wide setae, the larger being about 440 μ and the other about 370 μ. Telofemur also with two long setae of about 370 μ and 320 μ, respectively. Apart from these charasteristics both joints have many strong setae. Tarsus I with weak hairs.

Leg II very enlarged. Coxa with two setae, the posterior being long measuring 407 μ. At the anterior margin of the coxa is a spine, which is very wide and sharp pointed. Basifemur and telofemur with a long dorsal seta, the former measuring 405 μ and the latter 190 μ. Tarsus II has a few stout spines.

Leg III with two spines in the coxae and spines of the tarsi, weaker and wider than those of leg II.

Leg IV with a seta in the coxa and spines in the tarsi, which are weaker and wider than those of leg III.

This description is based on the holotype ♀. No. 1042 in the collection of the Instituto Butantan, excepting the gnathosoma, which has been described from that of a paratype, dissected for this purpose.

Gnathosoma

Measures 392 μ up to the apex of the *corniculi*, a dissection of a paratype having been necessary for a minute study.

Palps — Without particularities worthy of note.

Epistoma — Wide at the base, suddenly narrower towards the apex, which terminates in a sharp point.

Mandibulae — Strong, well chitinized; joint which permits insertion of the fingers, measuring 300 μ in length by 85 μ in width. *Digitus mobilis* 145 μ.

in length, distal extremity curved, as in other species of the genus, with two teeth distant from the extremities and well separated from each other; the distal tooth is 22 μ and the proximal 44 μ from the anterior extremity. The *digitus fixus* has a larger tooth, situated in a position corresponding with the space between the two teeth of the *digitus mobilis* and a smaller one, sub-terminal at the height of the distal extremity of the *digitus mobilis;* of the very small intermediate tooth, which occurs in other species of the genus, there is only a trace to be seen a little in front of the undilated *pilus dentilis,* which appears in this finger. At the base of the *digitus mobilis* is the *pulvillus* with the usual crown of setae and the transparent globose formation, already found in other species. There is also between the two fingers the same lamellar formation, frequently found in the genus, where it seems to be constant. Near the base of the *digitus fixus* is the short and dilated seta, already verified in other species.

Labrum — triangular, long, longitudinally grooved and pilous up to the apex.

Paralabra — wide, and with a rounded apex.

Malae internae — in form of pilous *laciniae.*

Styli in form of hyaline stems

Maxillicoxae with the usual setae, the *postero internae hypostomatis* being the longest.

Rima hypopharyngis with 12 series of one to two denticles.

Corniculi of normal chitinization and shape.

Description of the ♂

The only ♂ specimen found, belongs to the lot No. 954, caught on *Nectomys squamipes* in the Federal District by Dr. Fabio Werneck, preserved in the collection of the Instituto Butantan, under the No. 1043.

Male much smaller and narrower than the female, of different shape, weakly chitinized.

Idiosoma

1320 μ in length by 820 μ in width at the level of the IV pair, the margins of the body being straight and parallel from the posterior margin of the II pair up to the middle of the opisthosoma, where it becomes narrower up to posterior extremity.

Ventral side

Holoventral shield — Of weak chitinization, more pronounced in the lateral parts of the anal segment, with reticulated surface. The anterior margin of the sternal does not present the projection which the females have, the only pro-

jection lying at the point in which the genitalia is found. There is also no trace of the pre-sternal. The shield has prolongations between the coxae, more pronounced between the coxae I and II, dilating considerably at the level of the posterior margin of coxa IV, occupying nearly the whole ventral zone and leaving free only the lateral margin. The setae of the sternal zone are in the usual position, the anterior, which are the finest, measuring 185 μ, the middle ones 298 μ and the posterior 230 μ. The metasternalia measure 194 μ. The genital measure only 160 μ. The zone which lies behind this is densily covered with some 80 short and rigid setae, which vary in length from 88 to 110 μ. The holoventral shield becomes narrower in the anal zone, where it acquires a deeper colouring, the usual seta being visible, the unpaired of about 185 μ and the paired about 90 μ.

Tritosternum — Wide at the base, divided into two narrow *lasciniae*, pilous from the point of bifurcation.

Stigmata — at the level of the space between the coxae III and IV.

Peritrematalia visible up to the anterior extremity of the dorsal shield.

Uncovered ventral side with some short setae.

Dorsal side

Shield of the idiosoma very weakly chitinized, even at the anterior extremity, having no sculpture in the allotype. At the anterior extremity, the three pairs of setae already described in the ♀. Submedian setae as in the ♀. Submarginal setae very long up to 205 μ, approximately the same size as the two long posterior setae of the shield. The two small posterior submedian setae measure only 45 μ.

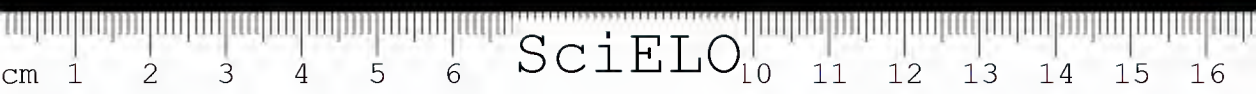
Legs

Leg I only slightly enlarged; coxa I with two setae and serration at the distal margin; basifemur I with longer setae not reaching, moreover, the large dimensions of the homologous seta of the ♀.

Leg II enlarged. Coxa II with posterior seta much shorter than that of the ♀. Trochanters, basifemur, telofemur, tibia and tarsus with very strong spines, visible in the tarsus and in the trochanter, these being the only strong spines found.

Coxa III with short and fine seta.

Gnathosoma

No minute examination can be made, owing to the retraction of the mandibulae. It measures 305 μ from the base of the *maxillicoxae* to the apex of the *corniculi*.

Mandibulae — The joint, which permits insertion of the mandibulae, is 150 µ in length, having *pulvillus* with a crown of setae which could be seen by transparency in spite of the retraction of the mandibulae. The *digitus fixus*, stem-like and curved inwards and flexible, measures abunt 220 µ, and looks as if it were crossed by a canal. It was not possible to verify if a lateral process exists.

Labrum triangular, longitudinally grooved, pilous at the margins, ending in a sharp point.

Malae internae in form of long, pilous *lasciniae*.

Epistoma, paralabra and *styl* were not seen.

Corniculi very weakly chitinized and extraordinarly elongated, ending in a larger.

Rima hypopharyngis with 12 series of two to four denticles.

Corniculi very easily chitinized and extraordinarily elongated, ending in a point which is long and very weak.

VI

Gigantolaelaps comatus, sp. n.

On an unidentified field-rat, caught by us in the grounds of the Instituto Butantan, S. Paulo, we found a single ♀ specimen of a species of the genus *Gigantolaelaps* which, although similar to *Gigantolaelaps butantanensis* FONSECA, 1935, is distinguished from the latter by the greater length of the setae of nearly all regions of the body, as may be seen by comparing the redescription of *G. butantanensis* with the description of the sp. n. which follows:

Description of the ♀

Idiosoma

Measures 1760 µ in length by 1300 µ in breadth at the level of the IV pair in the holotype, somewhat flattened.

Ventral side

Sternal plate — Measures 400 µ in breadth at the level of the lateral anterior angles and 480 µ at the level of the lateral posterior by a length of 350 µ at the median line up to the anterior margin of the anterior projection. The anterior projection reaches nearly the base of the tritosternum. The surface of the plate shows reticulation which is more apparent at the sides; the lateral

and posterior margins are nearly straight, only the former being thickened. The anterior setae measure 380 μ and the median and the posterior 400 μ in length. Pre-sternal visible at the front and from the sides of the sternal projection, weakly chitinized.

Metasternalia very easily chitinized, as is the rule in this genus, with setae of 370 μ in length.

Genital plate — of about 520 μ, with maximum breadth of 250 μ being, therefore, very slightly expanded behind.

Anal plate — about 220 μ in width, by 260 μ in length, more or less. *Anus* about 80 μ and at 40 μ from the anterior margin of the plate. Surface of the plate grooved by longitudinal lines laterally, with anterior angles more defined. Setae implanted in tubercles, the paired situated at the back of the level of the middle of the anus and very long, measuring about 300 μ and the unpaired about 370 μ in length. Zone of the *cribrum* wide, not surpassing, however, the posterior seta.

The unprotected zone of the ventral side is densily setous and characterized by the length of the setae, which is therefore one of the characteristics of the species; the majority of them measures about 205 μ, the smaller ones being 130 μ; there is even one pair at the side of the *cribrum* with 350 μ.

Tritosternum wide at the base, with *lasciniae* which are pilous from the beginning.

Stigmata at the level of the space between the coxae III and IV.

Peritremata visible up to the posterior margin of coxa I.

Peritrematalia weakly chitinized, seeming to reach the anterior extremity of the dorsal shield.

Dorsal side

Shield of the idiosoma — Weakly chitinized, as also the whole of the specimen under consideration. The lateral margin is left exposed and densily covered with long setae. Surface of the shield reticulated and sculptured. The setae of the shield are long, those of the small posterior pair measuring 162 μ and the majority 260 μ, some reaching 300 μ. Some circular marks are seen on the surface.

Legs

Legs I and II very enlarged and III and IV also enlarged, in comparison with other species.

Coxa I with two setae, of which the distal is fine. The two long setae of basifemur I are even larger than usual, measuring 580 μ and 520 μ in length.

Telofemur I with the two larger setae 400 and 330 μ in length. Width of the basifemur and of the telofemur in the articulation 260 μ. Tarsus I with weak hairs.

Coxa II with long dorsal spine and two ventral setae, of which the posterior with 440 μ. Seta of the basifemur II with 380 μ and the width of this joint, at the articulation with the telofemur, 300 μ. Tarsus II with long and stout setae.

The setae of tarsus III are stronger and longer than those of tarsus II; those of tarsus IV are longer and weaker than those of tarsus III.

Description of the holotype ♀, No. 115 in the collection of the Instituto Butantan, caught by the author.

Gnathosoma

It measures 390 μ up to the apex of the *corniculi*, a minute examination having been impossible, as only the holotype exists.

Mandibulae wide and stout as in the other species, the joint, which permits insertion to the fingers, measuring 260 μ. The *digitus mobilis* is 135 μ in length and has two teeth, which are distant from each other and from the apex, which is curved. *Digitus fixus* with strong proximal tooth and two sub-apical teeth which are small and equal, seeming in this last characteristic, to differ from the remaining species. We are not positive about this, as we were only able to observe it in one of the *mandibulae*. *Pilus dentilis* not dilated nearer the basal tooth. *Pulvillus* with transparent globose dilatation and with a crown of setae at the base of the *digitus mobilis;* single seta, short and wide, at the base of the *digitus fixus*. Between the fingers of the mandibulae there is a transparent membranous lamina as has already been noted in other species.

Labrum lanceolated, longitudinally grooved, the point not very fine, pilous at the margins and even in the centre.

Paralabra rounded at the apex.

Maxillicoxae and *hypostoma* with usual setae.

Rima hypopharyngis with 10 series of one to three denticles.

c) — Redescriptions

In 1935 we presented to the VIII Section of the XII International Congress of Zoölogy and published in the "Memorias do Instituto Butantan" a preliminary note dealing with new genera and new species of *Acari* parasites of rats (5). We described briefly three new species of the genus *Gigantolaelaps* which we had observed up to that date in Brazil and which up to the time of

this writing are still the only ones found in this country. In the present revision of the genus we take the opportunity to give a redescription of the holotypes, to describe a male and a young and to present the respective drawings.

VII

Gigantolaelaps mattogrossensis (Fonseca, 1935)

syn: *Macrolaelaps mattogrossensis* Fonseca, 1935.

Fonseca, F. da — Acarological notes XVIII. New genera and species of *Acari* parasites of rats (*Acari, Laelaptidae*). Preliminary note *in* Memorias do Instituto Butantan X:17.1936.

Fonseca, F. da — New genera and species of *Acari Laelaptidae* from Brazilian rodents. *In* C. R. XII[e] Congrès Intern. Zool. 3:1597. 1937.

VII

Redescription of the holotype ♀

Gigantolaelaps mattogrossensis was originally described by us from material caught in Porto Jofire, State of Matto Grosso, Brazil, on the rat *Holochilus vulpinus* Brants, by Dr. Fabio Werneck. We subsequently had the opportunity of receiving the same species from Crato, State of Ceará, Brazil, living as a parasite on the rat *Holochilus sciureus* Wagner, caught by Dr. Hermann Lent and from Tobacal, Salta, Argentine Republic, living as parasites on undetermined field-rat, caught by Prof. Salvador Mazza.

The species is similar to *Gigantolaelaps goyanensis*, sp. n., from which it is distinguished by the distal seta of coxa I which is thinner in *G. mattogrossensis* and by the length of the sternal, smaller in *G. mattogrossensis;* it is also similar to *G. peruvianus* Ewing 1933, from which it may be distinguished by the fact that in *G. mattogrossensis* there are two long setae in the basifemur and two in the telofemur, whilst Ewing only reports one seta in each of these joints for his species; it is also distinguishable by the aspect of the posterior and anterior margins of the sternal plate, as may be seen from Ewing figure (3).

Idiosoma

Large species, the holotype measuring 2350 μ up to the apex of the palps, well chitinized, very pilous, with some very long setae in the plates and in the legs.

Idiosoma 1900 μ in length, the breadth in the holotype, which is somewhat flattened by the mounting, measuring 1528 μ at the level of the IV pair.

Ventral side.

Sternal plate very chitinized, the lateral margins being slightly concave and the posterior slightly convex, both thickened. Anterior margin with stout median projection which occupies nearly the whole presternal zone, not reaching however, the base of the tritosternum, which is encircled by a pre-sternal plate of weak chitinization. Antero-lateral angles more pronounced. Surface of the reticulated plate somewhat less chitinized at the level of the anterior median projection. The plate measures 370 μ in breadth at the level of the antero-lateral angles and 444 μ at the level of the postero-lateral, being 310 μ in length in the holotype; the length in other specimens examined varies between 260 μ and 330 μ, distinction being made in the case of *G. goyanensis*, as has already been pointed out. Of the setae the anterior are 325 μ, the middle ones 347 μ and the posterior 350 μ, having the same aspect as the other species of the genus. The anterior sternal projection is 88 μ in length by about 295 μ in width at the base. Pores with usual position and shape.

The *pre-sternal plate* appears more clearly than in *G. goyanensis*, in shape of a grooved stripe, which borders the anterior projection of the sternal plate.

The *metasternalia* chitinized at the level of the posterior margin of coxa III, where setae of 320 μ are implanted; thin anterior and posterior prolongations.

Tritosternum of wide base, with *lasciniae*, which are pilous from the point of bifurcation, reaching the level of the posterior setae of the hypostoma.

Genito-ventral about 555 μ in length by 300 μ in breadth somewhat more expanded at the back than in *G. goyanensis*, a certain variation in width being noticeable in other specimens, in which it is narrower than in the holotype. The chitinization is less than that of the sternal, the reticulation is wide and the sculpture, represented by three lighter spots at the level of the genital setae, three on each side, well separated. Genital setae of 280 μ. At the level of the posterior margin there are depressions corresponding to the implantation of the setae at the level of the middle of the anus, 185 μ in length, and unpaired 310 μ. Small plates on each side between the genito-ventral and the inguinalia and another one nearly touching the genito-ventral.

Anal plate separated from the posterior margin of the genito-ventral by a space of 407 μ in the holotype. Its length is impossible to measure in the holotype, as it accompanies the posterior margin of the idiosoma, the largest width being 236 μ. The general form is triangular, the surface reticulated and the lateral margins more chitinized, principally at the level of the anterior angles, where they form a projection. Anterior margin slightly convex with central depression. Paired

setae at the level of the middle of the anus, 185 μ in length and unpaired 310 μ Anus at about 50 μ from the anterior margin of the plate.

Setae of the exposed ventral zone, numerous, measuring from about 100 μ to 230 μ in length.

Inguinalia — Inguinal plates very chitinized, triangular, the greatest diameter being about 75 μ.

Stigmata at the level of the space between the coxae III and IV.

Peritremata visible in long extension.

Peritrematalia without posterior prolongation, with wider zones, heavily chitinized from the II pair onwards, passing to the dorsal side, where they can be followed up to the anterior extremity of the dorsal shield.

Dorsal side.

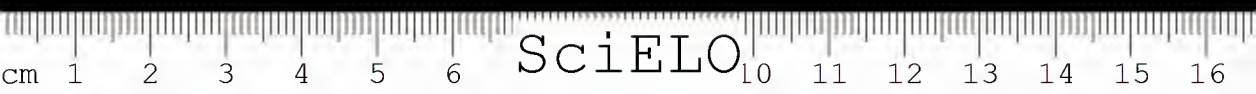
Dorsal shield with regular lateral margins, leaving a wide lateral and posterior margin uncovered, of heavier chitinization at the level of the anterior zone of the lateral margin and anterior extremity. Posterior extremity slightly concave. Length 1590 μ and width 1030 μ at the level of the IV pair. The setae of the shield have the usual arrangement. There are three pairs at the anterior extremity and about 11 submedian pairs, the first of which is very long, of about 300 μ and the posterior of 225 μ, the small submedian pair, which is directly in front of the posterior pair, measuring 80 μ. The submarginal setae are also long. The surface of the shield is reticulated and has numerous circular markings and abundant sculpture.

Legs

Legs I and II enlarged.

Coxa I with strong proximal spine about 78 μ by a width of approximately 15 μ at the base, and a distal seta of about 80 μ, which becomes rapidly sharp, ending in a thin point, in aspect very different from its homologue in *G. goyanensis*. Basifemur I with two long setae of 405 and 370 μ respectively and telofemur also with two of 260 and 230 μ respectively. Tarsus I with fine hairs.

Leg II very enlarged. Coxa II with posterior seta of 407 μ. At the anterior margin of coxa II is a wide dorsal spine. Distal margin of the middle joint with denticles. Basi- and telo-femur each with a longer seta, measuring respectively 405 and 185 μ. Tarsus II with strong setae and a longer basal one of 205 μ. Coxa III with the two usual strong spines and tarsi with longer and finer spines than those of coxa II. Coxa IV with one seta tarsus IV with and fine setae.

Redescription of the holotype, which is No. 15 in the collection of the Instituto Butantan.

Gnathosoma

Excepting the mandibulae and the epistoma, which could not be examined in the holotype, the description of the gnathosoma coincides with that of *G. goyanensis.*

VIII

Gigantolaelaps butantanensis (FONSECA, 1935)

syn.: *Macrolaelaps butantanensis* FONSECA, 1935.

Fonseca, F. da — New genera and especies of *Acari Laelaptidae* from Brazilian rodents. *In* C. R. XII^e Congrès Intern. Zool. 3:1597.1937.

Fonseca, F. da — Acarological Notes XVIII. New genera and species of *Acari* parasites of rats (*Acari Laelaptidae*). Preliminary note. *in* Memorias do Instituto Butantan X:17.1936.

This species was originally described by us in 1935 (5) from material caught on a field-rat. *Oryzomys eliurus* WAGNER (No. 226), Butantan. São Paulo, Brazil. Subsequently we obtained material from rats of undetermined species from the suburbs of the city of S. Paulo and from Barra do Rio S. Domingos, State of Goyaz. A ♂ was caught in the laboratory.

This species also resembles another now described, *Gigantolaelaps comatus,* sp. n., from which it is mainly distinguished by the presence of long setae on the ventral side of the latter.

Redescription of the ♀ holotype.

Species of normal size for the genus, the holotype, which is moreover somewhat flattened by the process of mounting, measuring 2350 μ up to the apex of the palps or about 2100 μ up to the apex of the *corniculi.*

Idiosoma

1920 μ in length, the width in the holotype is 1500 μ: making an allowance for the flattening of the especimen, it should not in reality exceed 1300 μ.

Sternal plate with the normal aspect of the genus, measuring about 400 μ in width at the height of the antero-lateral angles, and about 510 μ

at the level of the posterior, by a length of 320 μ at the median line, up to the margin of the anterior projection. The anterior median projection measures about 90 μ in length by about 240 μ in breadth at the base, reaching the tritosternum. Of the pre-sternal only a stripe is seen, which encircles the projection of the sternal. Anterior pair of setae about 340 μ in length, already inserted in the anterior projection; middle pair 370 μ and posterior about 350 μ in length. The surface of the plate is reticulated and the posterior and lateral margins very thick. Between the coxae I and II a prolongation of short extension. Pores of normal situation.

Ventral side

Metasternalia weakly chitinized, enlarged, with setae of about 350 μ equal to the sternal setae.

Genito-ventral 450 μ in length, or 550 μ including the *epigyne*, by 260 μ at the widest point, the least width being 225 μ; the posterior dilation is, however, insignificant. The pair of genital setae measures 290 μ. The surface of the plate seemed smooth, but, as the specimen was mounted with the ventral side underneath, its clearness was reduced in the examination with a great enlargement and it was not possible to examine it through the slide, since its thickness did not provide sufficient focal distance. Three light submedian marks on each side at the level of the genital pair constitute the whole sculpture of this plate. The small enlargement of its posterior part results in the setae of the uncovered ventral surface being sufficiently far from the plate, for the latter to show hardly any impressions.

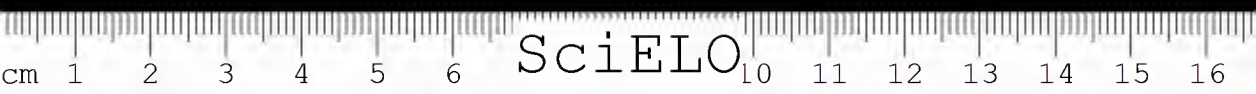
Anal plate — Lies at about 380 μ from the posterior margin of the genital in the holotype, which is a pregnant ♀, with a larva visible by transparency. Length 280 μ by 240 μ at the widest point, with anus about 30 μ from the anterior margin. Paired setae at the level of the posterior extremity of the anus, 200 μ in length. Unpaired seta of 340 μ. *Cribrum* not exceeding the point of implantation of this seta. Surface of this plate reticulated, with angles of punctuated aspect.

Uncovered ventral surface with numerous setae of 125 μ up to 300 μ, this length being only attained by the posterior submedian, the pair which is in front of the anal measuring 190 μ.

Stigmata at the level of the space between the III and IV pair of coxae.

Peritrema with tube visible up to the posterior margin of coxa I.

Peritrematalia without visible posterior prolongation, very chitinized in front, reaching the anterior extremity of the dorsal shield.

Dorsal side.

Dorsal shield with anterior extremity pointed and posterior with reentrance in obtuse angle, 1650 μ in length by 960 μ in width at the level of the IV pair, the anterior and posterior marginal zones being left uncovered. The surface is reticulated with sculpture of light marks, more abundant in the anterior zone. The anterior extremity, heavily chitinized, has the usual three pairs of setae and one pair of pores. The submedian pair which follows those is very long, 330 μ in length. The posterior submedian pair is 280 μ and the small smooth pair behind this measures 162 μ, being, however, much larger than usual and comparable to that of *G. comatus*. The remaining setae of the shield are all very long, the majority measuring 260 to 300 μ.

Legs

First and second pair enlarged.

Coxa I with two setae, of which the distal is much finer. Basifemur I with one extremely long seta, of 540 μ and another one of nearly the same size, 495 μ. Telofemur I wide 220 μ with a seta of 370 μ and others of 240 μ still further strong setae which are, however, shorter being visible in both joints. Tarsus I with thin hairs.

Coxa II with two setae, of which the posterior with 380 μ and the anterior short. Basifemur II with seta of 260 μ in length. Telofemur II with 260 μ at the widest point and with a dorsal seta of 185 μ. Tarsus with strong spine-like setae.

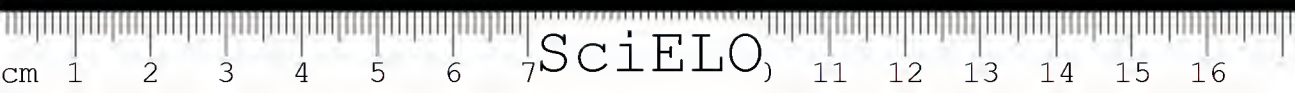
Coxa III with two spines and tarsus III with stronger and longer setae than those of tarsus II.

Coxa IV with a single seta: tarsus IV with very long and fine setae. All the tarsi with *pulvillus* and strong claws, excepting the tarsus I, in which the claws are weaker.

Holotype No. 14 of the Instituto Butantan collection.

Gnathosoma

It measures 400 μ up to the apex of the *corniculi* and about 640 μ up to the apex of the palps.

Mandibulae — The joint which permits the insertion of the mandibulae measures 300 μ in length by 75 μ in width; it has a *pulvillus* with crown of setae at the base of the *digitus mobilis* and short seta at the base of the

digitus fixus. *Digitus mobilis* of curved extremity with two teeth well separated and distant from the apex. *Digitus fixus* with one subterminal tooth, a very small one directly behind this and another one, the larger, very distant; the *pilus dentilis*, not dilated, is implanted between the two last mentioned.

Labrum with the usual lanceolated shape, longitudinally grooved and pilous at the margins.

Styli in form of stems, which are slightly curved inwards and of external situation.

The remaining parts are not visible in the holotype.

Description of the ♂

The only male found amongst numerous female specimens examined from many hosts, was that taken from a field-rat of undetermined species, No. 413, caught by us at Butantan, São Paulo, on 12-7-34.

Like the ♂ of *Gigantolaelaps gilmorei* it is an acarian of nearly elliptical contour; anterior extremity more pointed, without shoulders, setous body, the setae, however, being fine, and spines only visible on leg II.

Idiosoma

The idiosoma measures 1508 μ in length by 1100 μ at the widest point at the level of the coxae IV.

Ventral side

Tritosternum fine, forked, relatively short, filamentous.

Ventral plates sunken, with median chitinization, reticulated. Sternal zone with anterior projection as in the female of the genus, but much less pronounced, nearly the whole of the projection being occupied by the opening of the masculine genital organ; this aspect differs, however, from that of *Gigantolaelaps gilmorei*, sp. n., in which there is no such projection in the ♂. Lateral margins of the sternal zone somewhat thickened. Anterior setae of the sternal with 230 μ implanted in the inferior limits of the projection. Median setae of 244 μ and posterior setae somewhat unequal, 244 μ on one side and 260 μ on the other. In front of the sternal can be clearly seen the presternal of easy chitinization, depressed in the centre of the anterior margin, not touching the tritosternum. Metasternal setae of 220 μ and genital setae of 228 μ.

The ventral zone is expanded directly behind the legs of the IV pair covering the whole region up to the inguinal zone and becoming gradually narrower backwards up to the anal, with undulated margins and with reentrances; on its surface there are about 70 fine setae of 105 to 150 µ, there being, however, less setae in this region than in *Gigantolaelaps gilmorei*. The anal plate is distinguished from the ventral by the more elongated reticulation, its outline is more rounded than that of *G. gilmorei*. The *cribrum* does not exceed the level of the implantation of the unpaired seta. The anus, elliptical, measures 70 µ. The paired setae are at the level of the posterior extremity of the anus and measure 135 µ and the unpaired on, fine and flexible, like the paired, measures 220 µ.

Stigmata at the level of the space between the coxae III and IV.

Peritrema visible up to the middle of coxa II.

Peritrematalia visible up to the anterior extremity of the shield, more chitinized from the coxa II onwards, with more enlarged zone between the coxae II and III, a posterior prolongation to the stigmata having not been seen.

Dorsal side

Dorsal shield covering nearly all the idiosoma, measuring 1470 µ in length by 920 µ in breadth at the level of the IV pair; this is distinguished from that of *Gigantolaelaps gilmorei* principally as it has the posterior extremity chamfered as in the ♀, this chamfering, however, being less pronounced.

Its pilosity is scanty, the setae being fine and long. The small setae of the posterior submedian pair measure 76 µ, being, therefore, somewhat smaller than in *Gigantolaelaps gilmorei*. The surface of the shield is reticulated, with more abundant sculpture in the median zone of the anterior half and has some pairs of circular marks.

Legs

Relatively fine, only the leg II being slightly enlarged.

Leg I with two long setae at the dorsal side of the basifemur, of 250 µ and 175 µ respectively, without spines; tarsus I with fine hairs.

Leg II somewhat enlarged, basifemur II with a long dorsal seta, of 168 µ, and a short ventral spine. A short spine in each of the two following joints; tarsus II with two strong spines, of which the largest is the median, ventral, of 52 µ and stout setae.

Tarsus III with stronger setae than those of tarsus II, and tarsus IV with longer setae, which are, however, weaker than those of tarsus III.

Allotype ♂ No. 1002 in the collection of the Instituto Butantan.

Gnathosoma

It could not be accurately examined as it has suffered distorsion in the holotype.

Maxillicoxae with the usual setae, the *postero internae hypostomatis* being the widest.

Corniculi only slightly chitinized and very elongated, as in *Gigantolaelaps gilmorei*, sp. n., recalling the aspect of the *corniculi* of the ♂ ♂ of *Ixobioides butantanensis* Fons., 1934.

Paralabra rounded at the apex, membranous, with some short hairs at the point.

Malae internae short, hardly visible.

Styli invisible.

Mandibulae with short, wide fixed fingers; it seems to be crossed by a canal with a short and fine prolongation at the union of the 1/3 anterior with the 2/3 posterior, at the internal side.

Epistoma membranous, sharp pointed in the apex.

Deutonympha

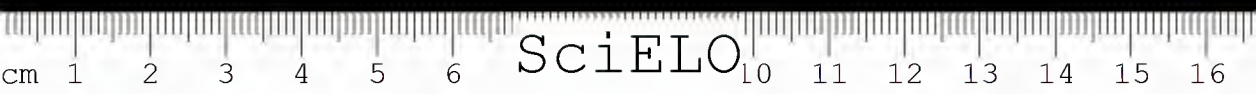
Only two specimens were found in the abundant material examined, the other phases, protonympha and larve, not having been seen.

The general characteristics agree with those of the female, which they greatly resemble, the chitinization, however, being much less; measuring about 1450 μ up to the *corniculi*.

Idiosoma

Much longer than wide, 1340 μ in length.

Ventral side

Sternal-metasternal — Of very weak chitinization, with maximum width at the sternal zone 214 μ, narrowed in the metasternal zone, in a general form of a

racket. measuring 440 µ in length. reaching the level of the genital setae. Anterior setae of 148 µ. middle ones 170 µ. and posterior 165 µ. There is no projection at the anterior margin as in the ♀♀.

Pre-sternal of still weaker chitinization. reticulated. reaching the base of the tritosternum.

length.

Setae of the metasternal zone 130 µ and of the genital zone 110 µ in

Anal plate triangular. of anterior margin nearly flat. 185 µ in length by 170 µ in width. of reticulated surface. with anus 50 µ from the anterior margin. Paired setae situated in. level a little behind the middle of the anus. measuring 122 µ and unpaired seta 165 µ. *Cribrum* rising laterally up to the level of the unpaired seta.

Stigmata at the level of the IV pair of coxae.

Peritrema with fine tube, visible up to coxa I.

Peritrematalia much less chitinized than in the ♀♀. visible up to coxa I.

Tritosternum wide at the base, with long *lasciniae*, which are pilous from their point of origin.

Dorsal side

Dorsal shield covering nearly all the idiosoma, reticulated, slightly chitinized. very sculptured. measuring 1320 µ in length by 740 µ in width at the level of the IV pair. The setae have a very similar aspect to those of the ♀♀. the posterior pair measuring 170 µ and the small pair, which is directly in front of the latter 68 µ. The shield is not so pointed in the anterior extremity. nor so chitinized as in the ♀♀ and the middle pair of the setae of this extremity is clearly turned outwards. The lateral setae of the shield are larger than the submedian, excepting the first submedian pair which is long.

Legs

Te coxae have no spines, showing only the usual setae. The posterior seta of coxa II has not the exaggerated development which is to be seen in the ♀. The basifemur I has two longer setae, the larger of which, however, does not exceed 130 µ in length. Telofemur I without long setae. Basifemur II with a somewhat larger seta, of 108 µ. Of the tarsi the third pair has stronger setae. Of the legs only leg II is somewhat enlarged.

Deutonimpha described from specimens caugth on field-rats *Zygodontomys lasiurus* LUND, No. 744 and the undetermined species No. 800 together with ♀♀

of *Gigantolaelaps butantanensis*, in Butantan, State of S. Paulo: Nos. 1004 and 1007, in the collection of the Instituto Butantan.

Gnathosoma

As far as it was possible to acertain without dissection, this showed no difference from that of the ♀ : the *labrum*, however, seemed shorter and the *malae internae* more developed. The teeth of the *digitus fixus* could not be examined either, due to the bad position of the mandibulae.

IX

Gigantolaelaps brachyspinosus (FONSECA, 1935)

syn.: *Macrolaelaps brachyspinosus* FONSECA, 1935.

Fonseca, F. da — Acarological Notes XVIII. New genera and species of *Acari* parasites of rats (*Acari Laelaptidae*). Preliminary note. *In* Memorias do Instituto Butantan X:17.1936.

Fonseca, F. da — New genera and species *of Acari Laelaptidae* from Brazilian Rodents. *In* C. R. XII^e Congrès Inter. Zool. 3:1597.1937.

Only the ♀ holotype of this species is known, caught in Porto Jofire, State of Matto Grosso, by Dr. Fabio Werneck on the field-rat *Holochilus vulpinus* BRANTS, this holotype, moreover, badly preserved, and lacking legs and numerous setae; it figures in our collection, at the Instituto Butantan, under the No. 16.
The species is characterized by the fact that it has strong spines in the unchitinized zones of the body, principally at the lateral margins of the idiosoma, as also real spurs at tarsus II.

Idiosoma

It measures 1770 µ in length by about 1300 µ in width.

Ventral side

Sternal plate — It has the antero-lateral and postero-lateral angles projecting as also two submedian projections at the posterior margin, which can be seen outlined in certain species of the genus. The median projection of the anterior margin reaches the base of the tritosternum. The plate measures 300 µ in width at the level of the anterior pair of setae and 420 µ at the level of the postero-

lateral angles. The length at the median line is 260 μ. Of the setae of this plate only one posterior is preserved in the holotype, measuring 340 μ in length.

Metasternalia only slightly chitinized, with setae of 300 μ.

Genital plate short, about 460 μ in length by 200 μ at the widest point; it is, however, very slightly expanded posteriorly. In the zone of the genital setae there are some sculptured marks, the plate not seeming to be reticulated. The genital setae, broken at the base, could not be measured.

Anal plate at about 370 μ from the genital, of about 220 μ in length by 200 μ in width, with thickened angles and paired setae at the level of the posterior margin of the anus and not at the level of the middle of the anus as is said in the original description. Anus at about 35 μ from the anterior margin of the plate and of 65 μ in length. The anal setae do not exist any more in the holotype; it can be deduced from the implantation that the unpaired one must be the larger. The zone of the *cribrum* does not go beyond the implantation of the unpaired seta.

Tritosternum wide at the base and with *lasciniae* which are pilous from the point of emergence.

Setae of the exposed zone of the ventral side distinct in the median and submedian zones and in the lateral; in the former they are fine and only about 4 μ in width at the base, and in the latter they are wide, real spines about 80 μ in length by 10 μ in width, the greatest width being in the lateral anterior zone of the idiosoma. A submedian posterior pair is fine and long, measuring 160 μ in length.

Stigmata at the top of the space between the coxae III and IV.

Tube of the peritrema visible up to the anterior margin of the coxa I.

Peritrematalia visible up to the anterior extremity of the dorsal shield.

Dorsal side

Dorsal shield 1350 μ in length by 790 μ in width, with posterior extremity truncated reticulated surface, with abundant sculpture. All that can be said of the setae of the shield is that they must be wide, as can be presumed from the marks of implantation, and that the submedian posterior pair of small setae measure 75 μ.

The anterior uncovered lateral zone of the dorsal side has, like the ventral, numerous strong spines which characterize the species.

Legs

Legs I and II enlarged.

In the coxa I only the distal thin seta is preserved. In the basi - and telo-femur I, both enlarged, there are implantations of strong setae, devided at the base. Tarsus I with fine hairs.

Coxa II with posterior seta of 180 μ. Tarsus II short and wide with an enormous apical spur 80 μ in length by 30 μ in width at the base and a thimer one at the middle of the joint.

Coxa III with wide posterior spine.

Coxa IV with wide setae and tarsus IV with spine-like and long setae.

Gnathosoma

Epistoma lamellar, wide at the base and pointed at the apex.

Mandibulae — The joint which permits the insertion to the fingers of the chelicerae measures about 90 μ at the greatest width and shows the *pulvillus* with a crown of setae at the base of the *digitus mobilis* and a small wide seta at the base of the *digitus fixus*. *Digitus mobilis* of curved apex, with two teeth separated from each other and from the distal extremity, the proximal somewhat larger. In the *digitus fixus* only the proximal and the distal tooth, and a *dentilis*, situated between them, could be seen, owing perhaps to the position of the mandibulae.

Labrum lanceolated, pilous, grooved longitudinally.

Mallae internae seemed to have aspect of pilous *laciniae*.

BIBLIOGRAPHY

1. Vitzthum, Count H. — *in* Willy Kükenthal — Handbuch der Zoologie. III (1) :142.1931. N.° 1, 3.rd Part) :142.1931.
2. Ewing, H. E. — Manual of external parasites. Baillière, Tindall & Cox, London, 1929.
3. Ewing, H. E. — Proc. U. S. Nat. Mus. 82 :2-14.1933.
4. Vitzthum, Count H. — Treubia 8(1-2) :1-198.1926.
5. Fonseca, Flavio da — Mem. Inst. Butantan 10:17.1936.
6. Berlese, A. — Redia 1:259.1910.
7. Trägardh, G. — *in* Sjöstedt's Schwed. Exped. Kilimandjaro 3:54-59.1910.
8. Berlese, A. — Redia 13:129.1918.
9. Hirst, S. — Proc. Zool. Soc. London :971.1923.
10. Hirst, S. — Proc. Zool. Soc. London :49-69.1925.
11. Oudemans, A. C. — Ent. Berichte 1(18) :160.1904 *et* Notes Leydi Mus. 24(9) :223.1904. Mem. Inst. Butantan, published *in separata* in 1935.

(Trabalho da Secção de Parasitologia e Protozoologia do Instituto Butantan. Dado à publicidade em Junho de 1939).

616.968.5:595.42

NOTAS DE ACAREOLOGIA

XXVI. Novos estudos sobre o genero *Laelaps* Koch, 1836 (*Acari. Laelaptidae*).

POR

FLAVIO DA FONSECA

(*com 9 figuras no texto*)

Em 1935 foi-nos dado publicar o resultado de uma primeira inspeção da fauna brasileira de acarianos pertencentes ao genero *Laelaps* Koch, *sensu strictu* (1).

Abandonado o conceito lato do genero, contemporaneo de Berlese e ainda em vigor até o fim do primeiro quarto deste seculo, como o demonstram os trabalhos de Ewing em 1925 (2) e do Conde Vitzthum em 1926 (3), pareceria logico prever grande abalo na importancia do genero tipo da familia, redundante da dispersão, por novos generos que iam sendo propostos pelos especialistas, de toda uma serie de especies, nele até então incluidas e de numerosas outras a descrever.

Tal previsão, porém, parece-nos destinada a completo desmentido pelas recentes aquisições da sistematica do grupo.

Limitada a acepção generica por Stanley Hirst, em 1926 (4), reduzida por Vitzthum no mesmo ano (3), restringida por Ewing, primeiro em 1925 (5) e em seguida, mais energicamente, em 1933 (6), foi o seu valor sistematico precisado com vigor ainda maior, quando, em 1935, creámos os generos *Mysolaelaps* Fons., *Ichnolaelaps* Fons., (7) e *Cavilaelaps* Fons. (8). Apesar dessas sucessivas mutilações, conservou, todavia a diagnose do genero *Laelaps* amplitude bastante para incluir, no primeiro estudo feito sobre a fauna brasileira, as cinco novas especies propostas no trabalho citado (1).

Passados mais dois anos de coleta de material acareologico, já se torna, entretanto, necessaria nova e mais profunda incursão na sistematica do grupo. Em-

bora venham simultaneamente descritas, em outro trabalho desta mesma publicação (9), cinco novas especies que, até 1929, antes da vinda à luz do trabalho citado de Ewing, seriam certamente incluidas no genero *Laelaps*, seis outras especies coincidem ainda plenamente com a diagnose restrita hoje admitida.

Tal abundancia de material demonstra a importancia sistematica e parasitologica do genero em estudo e bem justifica a opinião externada pelo notavel acareologista Conde Vitzthum ao descrever *Laelaps jettmari* Vitzthum, 1930 (10), quando asseverava que o genero *Laelaps* não tinha ainda sido trabalhado como já o permitiam os conhecimentos da epoca.

Si tal conceito exprime a verdade para a fauna de regiões melhor exploradas sob o ponto de vista acareologico, é ainda mais aplicavel às condições do Brasil, onde bem se poderá assegurar que sobre a sistematica deste grupo nada havia sido feito antes de 1935. A esta asserção somos levados por não nos ser possivel continuar a admitir a inclusão neste genero da especie *Laelaps brasiliensis* Ewing, 1925; tanto quanto podemos induzir da descrição sumarissima do autor da especie (2), é no genero *Cavilaelaps* Fons., 1935 que se deverá encontrar a correta posição sistematica para este acariano.

Segundo a revisão bibliografica e sistematica que levámos a efeito ao elaborar o presente trabalho, o numero de especies que podem ser incluidas no genero *Laelaps*, tal como deve ser atualmente compreendido, orça em pouco mais de trinta, das quais mais de um terço (onze especies autoctones e duas cosmopolitas) caberão ao Brasil, onde, aliás, está por explorar a fauna, sem duvida riquissima, do distrito amazonico.

1. **Laelaps berlesei**, sp. n.

(Figs. 1 e 2)

Especie grande para o genero, muito pouco quitinizada, lembrando de muito perto *Laelaps echidninus* Berlese, da qual a distingue sobretudo a largura da genito-ventral, que é, além disso, angulosa.

Descrição do holotipo ♀

(Fig. 1)

Idiosoma

O idiosoma mede 1012 μ de comprimento por 735 μ de largura ao nivel do 4.º par. A forma é oval muito regular, não apresentando o afilamento da extremidade anterior caracteristica de *Laelaps echidinus* Berlese, segundo o fez notar Vitzthum (5).

Face ventral — Tritosterno piloso. Placa esternal levemente reticulada, quasi quadrada, medindo 243 de comprimento por 250 μde largura no lado anterior (excluidos os prolongamentos) e 281 no bordo posterior. O bordo anterior é levemente proeminente no meio, sendo os laterais retos na metade anterior e curvos na posterior; o bordo posterior é levemente concavo no meio. A placa apresenta prolongamentos extensos entre as coxas I e II e curtos entre II e III. Das cerdas, cuja situação é normal, as posteriores são pouco mais alongadas, medindo 190 μ; as medias têm 182 μ e as anteriores 168 μ. Os poros são constituidos por fendas muito estreitas com um ponto mediano dilatado. O reticulo existente à frente da esternal trae a presença de uma pre-esternal, mal aparente devido à fraca quitinização da especie.

As metaesternais são curtas e relativamente largas e têm uma cerda de 190 μ, ficando exatamente ao lado do intervalo entre as coxas III e IV.

Genito-ventral — A genito-ventral, fracamente quitinizada como todas as placas desta especie, tem conformação muito carateristica, lembrando de perto a de *Laelaps echidninus*. Distingue-se, todavia, facilmente desta especie, por ser a zona genital muito mais alargada, ocupando todo o intervalo entre as coxas IV que chegam a ser por ela tocadas. Além disso, o alargamento da zona expandida começa muito mais à frente do que em *L. echidninus*, sendo bem mais pronunciado do que nesta especie. Lateralmente tambem os bordos são diferentes, podendo-se mesmo classificál-os de angulosos e sinuosos. O bordo posterior, porém, se comporta exatamente como o de *L. echidninus*, quasi tocando o bordo anterior da anal. A superficie da placa é sulcada por 4 ou 5 linhas transversais sinuosas, tal como em muitas outras especies do genero. As cerdas genitais implantadas proximo dos bordos, medem mais ou menos 166 μ e são flexiveis. O par ventral anterior fica mais afastado do bordo. O par ventral medio fica logo atrás do ponto anguloso do bordo, existindo entre os dois um poro circular no bordo da placa. As cerdas posteriores estão situadas bem à frente do angulo posterior da placa. Quanto à distancia entre o bordo posterior da genito-ventral e o anterior da anal, é por tal forma diminuta, que as duas placas parecem tocar-se na linha media, não excedendo 2 μ o intervalo nesta zona.

Placa anal — Muito regularmente arredondada no bordo anterior e nos angulos, mede 188 μ de comprimento até o apice do tuberculo da implantação da cerda impar, não tendo podido ser medida até o *cribrum* por acompanhar a curvatura da margem posterior do corpo. A largura maxima, ao nivel dos angulos da placa é exatamente igual, 186 μ. O anus fica a 45 μ do bordo anterior e mede 56 μ de comprimento. As cerdas pares ficam exatamente ao nivel da extremidade posterior do anus e medem 102 μ. A impar, muito mais forte, mede 160 μ.

Placas inguinais — Mais longas do que largas, com 54 μ de comprimento.

Estigmas ao nivel do intervalo entre as coxas III e IV. *Peritrema* visivel apenas até o nivel do bordo posterior do I par. *Peritrematalia* prolongando-se posteriormente aos estigmas como é normal no genero.

Face dorsal — Escudo dorsal cobrindo todo o idiosoma, fracamente quitinizado, reticulado, sem escultura aparente, de bordos regulares, com a extremidade anterior mais estreita, mas não tão pronunciadamente quanto em *Laelaps echidninus*.

Além dos tres pares de cerdas anteriores do escudo, dos quais o primeiro, projetado para frente, é o mais curto, medindo 58 µ, e o terceiro o mais longo, com 150 µ, ha ainda dez pares de cerdas submedianas. O par posterior é o mais longo e mede 190 µ. Dos lados do penultimo par, que mede 98 µ, vêm-se duas manchas circulares. Além desses ha ainda cerca de 60 cerdas no escudo, quasi todas lisas, só em algumas sendo observadas farpas.

Patas

Das patas as do par IV são as mais longas, medindo 1012 µ e as do par II as mais largas. Coxa I com espinho distal e cerda fina proximal; coxas II e III com espinho posterior e cerda encurvada anterior; coxa IV com pequena cerda espiniforme mediana; dos espinhos das coxas o da coxa II é ligeiramente maior e o da coxa III o de ponta mais aguda; o rebordo anterior das coxas apresenta pecten de cerdas curtas, mais nitido nas coxas I e II. Femures das patas I e II um tanto alongados, com 2 cerdas mais longas. Tarso I com cerdas finas e tarsos II — IV com alguns espinhos mais fortes e longos no tarso III.

Gnatosoma

Palpos — Medem 220 do 1.º ao 5.º articulo, apresentando o 1.º articulo apenas as 2 cerdas ventrais, das quais a distal longa.

Maxillicoxae — Com cerdas de 34 µ.

Rima hypopharingis — Com series de 2 ou 3 denticulos.

Hypostoma — Pouco quitinizado, com as cerdas postero-externas mais longas medindo 76 µ.

Corniculi — Fracamente quitizinados.

Epistoma — Membranoso, largo, de bordo anterior denteado.

Labrum — Membranoso, triangular, piloso nos bordos.

Paralabra — Membranosos de bordo denteado.

Malae internae — Curtas, estriadas longitudinalmente.

Styli — Em forma de haste de ponta recurvada.

Mandibulas — Normais, medindo o genual 162 µ de comprimento por 38 µ de maior largura, com *pulvillus* com cerca de 10 cerdas largas para trás do *digitus mobilis* e pequena cerda no ponto limitrofe com o *digitus fixus*. *Digitus mobilis* com 70 µ, provido de dois dentes mais ou menos iguais. *Digitus fixus* com cerda de 58 µ, apresentando tres dentes menores do que os do *digitus mobilis*, dos quais o mediano é o maior e *pilus dentilis* de 20 µ, não dilatado.

Descrição do ♂

(Fig. 2)

Idiosoma

Pouco quitinizado, medindo 845 µ de comprimento por 590 µ de largura ao nivel da coxa IV, de forma oval regular, sem espaduas.

Face ventral

Placa holoventral começando ao nivel do bordo anterior da coxa II, com reticulado nitido, que lhe confere aspeto escamoso desde a região esternal até a genital. No bordo anterior da região esternal faz saliencia na parte media, o orgão masculino, para fóra do qual ficam insertas, no proprio bordo, as cerdas anteriores da esternal, que medem 120 µ, sendo ligeiramente menores e mais fracas do que as dos dois pares posteriores, que medem respectivamente 130 e 152 µ. As cerdas metaesternais são iguais ás esternais posteriores e as genitais iguais às anteriores. Existem ainda na zona genito-ventral, que é largamente expandida, ultrapassando o nivel das coxas, mais quatro pares de cerdas. No alotipo vê-se ainda à esquerda mais uma cerda, que à direita está implantada no tegumento descoberto. As cerdas anais pares medem 76 µ e ficam ao nivel do bordo posterior do anus. A cerda impar tem o dobro do comprimento dos pares. As cerdas das placas são todas lisas, sem entalhe. A superficie ventral descoberta do opistosoma apresenta do lado externo cerca de 12 cerdas, das quais as duas posteriores muito mais longas, todas farpeadas.

Ha vestigios de uma pre-esternal caraterizada por estriação transversal.

Tritosterno com lascinias pilosas desde a base.

Estigmas ao nivel do intervalo entre as coxas III e IV, prolongando-se as *peritrematalia* para trás e para frente até a extremidade anterior do idiosoma.

Face dorsal

Escudo dorsal cobrindo inteiramente o idiosoma, com estriação nitida, aparentemente sem escultura, de extremidade anterior pouco afilada. Apresenta 12 pares de cerdas submedianas e cerca de 50 outras entre estas e os bordos laterais, todas lisas e relativamente longas e flexiveis.

Patas

Patas I e IV são as maiores e pata II a mais curta e mais larga. Coxas I e II com duas cerdas fracas: coxa III com a cerda recurvada anterior e cerda espiniforme curta posterior; coxa IV com uma só cerda, menor e mais fina do que as das restantes coxas. Fémures das patas I e II com duas cerdas um pouco mais longas do que as restantes. A pilosidade dos tarsus aumenta de desenvolvimento à medida que são mais posteriores.

Holotipo — ♀, No. 147 da coleção do Instituto Butantan.

Hospedeiro — *Gallictis vittata* (No. 825) capturado pelo autor em Butantan, S. Paulo, a 26-8-35, achando-se o mesmo hospedeiro parasitado por *Liponissus* sp..

Gnatosoma

Epistoma membranoso, subdividido em tres laminas de apice arredondado

Mandibulas de descrição impossivel devido à sua retração.

Labrum largo, afilando no apice, finamente piloso e estriado no sentido longitudinal.

Palpos normais.

2. Laelaps aragonensis, sp.n..

Especie muito caracteristica e curiosa devido ao grande desenvolvimento apresentado por cerdas habitualmente finas nas restantes especies do genero, lembrando de perto a quetotaxia do genero *Neolaelaps* Hirst, do qual logo o distingue o fato de apresentar 4 pares de cerdas na genito-ventral.

Descrição da ♀

(Fig. 3 e 4)

Idiosoma

Especie de dimensões medias, tendo o idiosoma 700 μ de comprimento por cerca de 500 μ de largura ao nivel do 4.º par de patas. A quitinização é media.

Face ventral (Fig. 3).

Tritosterno largo, filamentoso desde o ponto de bifurcação das lascinias, as quais atingem o apice dos *cornicula*.

Placa esternal muito mais larga do que longa, medindo 83 μ de comprimento na linha mediana por 167 μ de largura ao nivel dos prolongamentos anteriores e 228 μ ao nivel dos posteriores. Seu bordo anterior é ligeiramente convexo, apresentando nos angulos externos os prolongamentos habituais, que mal se insinuam entre as coxas I e II; o bordo posterior é fortemente concavo, ficando a parte media mais ou menos ao nivel do meio da coxa II e as extremidades posteriores ao nivel do meio da coxa III. A superficie da placa é nitidamente reticulada, apresentando os dois pares de poros em forma de fenda com a situação habitual. Nela estão implantados tres pares de cerdas muito carateristicas por serem mais largas a pequena distancia do ponto de implantação, afilando-se em seguida lenta e progressivamente até o apice, que é muito agudo e flexivel. Os pares anterior e medio são iguais, com 90 μ de comprimento e o posterior um pouco maior, com cerca de 100 μ.

Um leve reticulado do tegumento anterior à esternal parece indicar a existencia de uma pre-esternal.

Metaesternais prolongando-se da esternal até o intervalo entre as coxas III e IV, com um par de cerdas iguais às esternais.

Genito-ventral muito carateristica, com grande expansão posterior, prolongando-se até proximo da anal, à semelhança do que sucede em outras especies do genero, com *L. echidninus* BERLESE, *L. lativentralis* FONS. e *L. berlesei*, sp. n.. A maior largura desta placa é de 235 μ um pouco para trás do terceiro par de cerdas. Seu bordo é fortemente convexo e o posterior fortemente concavo, contornando o bordo anterior da anal, do qual a separa, na linha media, um intervalo de cerca de 5 μ apenas. Sua superficie é percorrida por 10 linhas transversais, das quais as quatro posteriores de concavidade anterior, a quinta mais ou menos reta e as cinco anteriores de concavidade posterior. As quatro cerdas desta placa têm o mesmo aspeto das esternais, medindo as tres anteriores 80 μ e a posterior 95 μ, ficando implantadas a certa distancia dos bordos da placa; a cerda posterior fica a 58 μ à frente do angulo posterior da placa e a igual distancia do 3.º par.

Inguinais com 28 μ de comprimento, ovoides, de grande eixo antero-posterior.

Anal — Triangular, de bordo anterior convexo, adatado à concavidade do bordo posterior da genito-ventral, de superficie reticulada, com anus de 34 μ a 18 μ do bordo anterior. Cerdas pares com 42 μ, implantadas um pouco para trás do nivel do meio do anus e a igual distancia desta e do bordo externo da placa. Cerda posterior com 70 μ. *Cribrum* subindo dos lados pouco além do nivel da inserção da cerda posterior.

Estigmas ao nivel do intervalo entre as coxas III e IV. *Peritrema* passando para a face dorsal ao nivel da coxa II e visivel até o nivel da coxa I. *Peritrematalia* nitidas com pequeno poro atrás dos estigmas, passando para a face dorsal, onde se unem com o escudo dorsal.

Superficie descoberta da face ventral quasi núa, apenas apresentando seis cerdas de cada lado, das quais as posteriores mais longas.

Face dorsal (Fig. 4) — Parcialmente recoberta pelo escudo dorsal, que deixa, nas zonas media e lateral do idiosoma, larga faixa descoberta com algumas cerdas de aspeto igual ao das do escudo.

Escudo dorsal — Eliptico, de bordos levemente ondeados no centro, de superficie reticulada. Apresenta 11 pares de cerdas submedianas, dos quais o anterior dirigido para frente, medindo cerca de 25 μ e os restantes até o 9.° par com cerca de 60 μ; o 10.° par é minusculo, medindo apenas 12 μ e o 11.° é o maior, tendo cerca de 105 μ; as restantes cerdas do escudo, cerca de 60, todas de extremidade proximal larga e distal muito aguda, medem de 52 a 65 μ, com exceção dos ultimos pares marginais que são maiores. A zona anterior do escudo se apresenta mais fortemente quitinizada e resulta da fusão com as *peritrematalia* no seu percurso anterior.

Patas

As do par IV são as mais longas e mais finas; as do par II as mais curtas e alargadas.

As coxas do par I apresentam dois fortissimos espinhos iguais; as do par II um espinho posterior e uma cerda encurvada e forte anterior; as do par III um espinho posterior e uma cerda anterior menores do que as do par II; as do par IV apresentam na parte media uma unica cerda pequena e finissima, que contrasta fortemente com o aspeto das dos pares anteriores. Os fémures das patas I e II apresentam duas cerdas um pouco mais longas.

Cotipos — Dois exemplares ♀♀, No. 905 na coleção do Instituto Butantan, colhidos por R. M. Gilmore sobre "rato", em Anapolis, Estado de Goiás e enviados ao autor pelo dr. H. de Beaurepaire Aragão, a quem é dedicada a especie.

Gnatosoma

A pouca visibilidade da maioria das peças do gnatosoma impede a apresentação de uma descrição completa.

Maxillicorae — Caracterizam-se por apresentarem as cerdas transformadas em fortissimos espinhos em tudo identicos ao das coxas, o que torna a especie facilmente reconhecivel, lembrando o aspeto de *Neolaelaps magnistigmatus* (VITZTHUM) (*loc. cit.*). São tambem tipicas as cerdas postero-internas do hipostoma, as quais, ao contrario das postero-externas e das anteriores do hipostoma, são muito longas e largas.

3. **Laelaps thori**, sp.n..

(Fig. 5)

Especie pequena, de quitinização fraca e contorno eliptico.

Idiosoma

Idiosoma com 810 μ de comprimento por 530 μ de largura ao nivel da coxa IV. Não ha espaduas pronunciadas e o afilamento da extremidade anterior é pequeno.

Face ventral

Placa esternal apenas reticulada proximo dos bordos anterior e laterais, com a zona central pontilhada, medindo 150 μ de largura no bordo anterior, excluidos os prolongamentos entre as coxas I e II, e 200 μ no bordo posterior, excluidos os prolongamentos entre as coxas II e III. Seu comprimento, na linha mediana, é de 105 μ. O bordo anterior avança ligeiramente na zona situada entre as cerdas pares. Os laterais e o posterior são fortemente concavos. As cerdas anteriores ficam implantadas no bordo anterior, distando 58 μ uma da outra. As medias e as posteriores ficam afastados dos bordos laterais e posterior. O comprimento e a largura das cerdas esternais aumenta progressivamente à medida que são mais posteriores, medindo respetivamente, 76, 95 e 106 μ.

As placas *metaesternais* são alongadas, fundindo-se com o bordo posterior da esternal. Suas cerdas achavam-se fraturadas no holotipo.

A *genito-ventral* mede cerca de 210 μ de comprimento por 170 μ de maior largura ao nivel do segundo par de cerdas. E' pouco expandida e de contorno posterior muito regularmente circular. A sua zona ventral é percorrida por 4 linhas transversais, das quais as duas anteriores de concavidade posterior e a posterior de concavidade anterior, sendo a seguinte quasi reta. Os pares de cerdas genital e posterior medem 95 μ, sendo os restantes pouco menores. Os quatro pares se inserem diretamente nos bordos da placa e ficam dirigidos para trás.

Placa anal — Dista 80 μ do bordo posterior da genito-ventral, tendo contorno triangular, medindo 115 μ tanto de comprimento quanto de largura maxima. O anus mede 38 μ e dista 20 μ do bordo anterior. As cerdas pares ficam adiante do nivel da extremidade posterior do anus e medem 45 μ de comprimento, medindo a impar 95 μ. A superficie da placa é reticulada nos bordos. Os angulos são arredondados e o bordo anterior quasi reto.

Placas inguinais alongadas, muito estreitas, com cerca de 45 x 10 μ.

Tritosterno com lascinias pilosas.

Estigmas ao nivel do intervalo entre os pares III e IV.

Peritrema relativamente largo, visivel até a coxa I.

Peritrematalia prolongando-se triangularmente atrás dos estigmas, visiveis até a extremidade anterior do idiosoma; caminham fundidas ao escudo dorsal desde a altura do 1.º par de patas.

Face dorsal

Escudo dorsal terminando proximo da extremidade posterior do corpo, deixa uma estreita faixa descoberta desde a altura do 2.º par até a extremidade posterior. A superficie é toda reticulada e levemente esculpida anteriormente. Ha 13 pares de cerdas submedianas, incluidas as verticais e excluido o par posterior, e 12 pares marginais. O par submediano mais proximo do bordo posterior é o menor, medindo 50 μ; o par marginal posterior é o mais longo, tendo 98 μ. Para fóra do ultimo par submediano e para trás e para dentro do 10.º par marginal, ha duas marcas circulares, refringentes.

Patas

Os 1.º e 4.º pares são os mais longos e o 2.º o mais largo. Coxas sem espinhos. Fémures dos 1.º e 2.º pares com duas cerdas um pouco mais fortes do que as restantes. Tarsos com cerdas progressivamente longas e mais fortes do 1.º ao 4.º par.

Descrição feita de um holotipo ♀ que figura sob o No. 1011 na coleção do Instituto Butantan, sem indicação de proveniencia, nem de hospedeiro. O material é certamente brasileiro. A especie é dedicada ao notavel acareologista nordico Sig Thor.

Gnatosoma

Palpos normais.

Cerdas das *maxillicoxae* relativamente curtas, com 22 μ apenas, ao passo que as postero-internas do hipostoma têm 50 μ.

Labrum lamelado, relativamente estreito, de bordos serrilhados.

Mandibulas de aspeto normal, com coroa de cerdas nos *pulvilli*. *Pilus dentilis* não dilatado no *digitus fixus*. Outras formações do gnatosoma impossiveis de descrever no holotipo.

4. **Laelaps mazzai**, sp.n..

(Fig. 6 e 7)

Especie relativamente pequena e larga, robusta, sendo a ♀ bem quitinizada.

Descrição da ♀

(Fig. 6)

Idiosoma

Mede 700 μ de comprimento por 550 μ de largura ao nivel do 4.º par; espaduas bastante pronunciadas; extremidade anterior afilada.

Face ventral

Tritosterno largo na base, com lascinias muito transparentes, pouco visiveis no holotipo.

Placa esternal mais larga do que longa, com prolongamentos afilados entre as coxas I e II e prolongamentos pouco acentuados entre as coxas II e III. Mede 170 μ de largura ao nivel do bordo anterior, excluidos os prolongamentos, e 195 μ ao nivel do posterior, tendo, na linha mediana, o comprimento de 98 μ apenas. Sua superficie apresenta reticulo dificil de ser percebido. O bordo anterior reto, é levemente e o posterior fortemente espessado e ligeiramente concavo. As cerdas anteriores medem 85 μ, ficando implantadas ao nivel do bordo anterior, separadas por intervalo de 60 μ: as medias têm 125 μ de comprimento e ficam a cerca de 12 μ do bordo lateral; as posteriores ficam nos angulos posteriores e medem 136 μ.

A presença da pre-esternal é indicada pelo reticulado da superficie desde o bordo anterior da esternal até o tritosterno.

Metaesternais alongadas, pouco quitinizadas com cerdas de cerca de 135 μ

Genito-ventral — Relativamente curta e larga, medindo cerca de 200 μ de comprimento por 160 μ de maior largura. Ha quatro pares de cerdas, das quais o genital com 105 μ e o posterior com 72 μ, estando os dois restantes fraturados no holotipo. A superficie da placa é percorrida por 4 linhas transversais, das quais a anterior fortemente concava para trás e as duas posteriores ligeiramente concavas para frente.

Anal — Dista 105 μ do bordo posterior da genito-ventral, é piriforme e mede 105 μ de comprimento por 88 μ de maior largura. O anus mede 30 μ e dista 15 μ do bordo anterior da placa. As cerdas pares ficam ao nivel do bordo posterior do anus, achando-se fraturadas, tal como a impar, que se deduz, entretanto, pela marca da implantação, ser maior do que as pares. Os angulos laterais da placa, arredondados, são mais fortemente quitinizados, como ocorre em varias outras especies.

Placas inguinais elipticas, muito regulares, de grande eixo antero-posterior, com cerca de 30 μ de comprimento.

A superficie descoberta da face ventral apresenta cerca de 50 cerdas, tanto mais longas quanto mais posteriores, medindo o par posterior, que é de muito o maior, 115 μ, todas lisas, só as maiores apresentando ligeira rugosidade.

Estigmas ao nivel do intervalo entre as coxas III e IV. *Peritrema* passando ao nivel do II par para o bordo lateral.

Face dorsal

Escudo dorsal — De bordos ondeados, correspondendo ao alargamento das espaduas do idiosoma, muito afilado na extremidade anterior, com reticulado alongado ao nivel da zona anterior dos bordos, na qual é mais acentuada a quitiniza-

ção. A restante superficie do escudo tambem apresenta reticulo, sempre mais acentuado atrás das cerdas, onde o traço tem forma de *V* da concavidade posterior, abraçando o ponto da implantação da cerda. O escudo deixa larga margem descoberta lateral e posteriormente, sendo reto o bordo posterior entre as cerdas do ultimo par. As cerdas são mais numerosas do que habitualmente, principalmente no terço anterior do escudo, havendo 16-18 pares submedianos, incluido o vertical. As cerdas mais longas são flexiveis, como acontece com o 3.º par submediano, que é tambem o mais largo.

Na superficie do escudo vêm-se ainda algumas grandes marcas circulares, simetricas, das quais dois pares marginais posteriores. Ha tambem varios pares de poros em forma de fenda. As cerdas marginais são em numero de cerca de 12 para cada lado, estando as posteriores quebradas no holotipo; pela marca de implantação parecem ser muito longas e fortes. Todas as cerdas do escudo são lisas. Ha escultura areolar anterior.

A superficie dorsal descoberta tem cerca de 20 cerdas de cada lado, sendo maiores os dois pares posteriores.

Patas

Pata II ligeiramente alargada, bem como o genual I. Cerdas posteriores das coxas I — III espiniformes, largas, a da coxa II maior. Cerda distal da coxa I implantada quasi no meio do bordo posterior do articulo. Coxa IV com cerda muito fraca, proxima do bordo distal e mais perto do bordo anterir do que do posterior. O fémur II tem duas cerdas longas e o genual II uma. O tarso III é o que apresenta cerdas mais fortes e o IV o que as tem mais longas.

Gnatosoma

Palpos normais.

Epistoma membranoso, de aspeto foliaceo no apice.

Mandibulas retraidas no holotipo, não podendo ser descritas. O *pilus dentilis* não é dilatado.

Labrum lanceolado, com pilosidade muito reduzida.

Corniculi pouco quitinizados.

Cerdas das *maxillicoxae* e do hipostoma normais.

Descrição do ♂

(Fig. 7)

O material de que dispomos consiste de uma só femea, o holotipo, e tres exemplares ♂♂, dos quais foi feita a descrição. O fato de terem êsses ♂♂ sido capturados ao mesmo tempo que a ♀ sobre o mesmo hospedeiro não parasitado por outra especie do mesmo genero ou de genero proximo, faz já supor tratar-se de individuos da mesma especie. No caso vertente esta hipotese é ainda reforçada por argumentos de homologia morfologica, tais como a tendencia para hipertricose no escudo dorsal nos dois sexos e a identidade de aspeto de certas cerdas.

Idiosoma

De forma eliptica, com espaduas apenas acentuadas, com extremidades anterior ligeiramente acuminada. A quitinização é media. Tem 552 μ de comprimento por 420 μ de largura ao nivel do 3.º par.

Face ventral — O aspecto da face ventral torna os machos desta especie muito caracteristicos, pois em vez de apresentarem um escudo holoventral, resultado da fusão das placas esternal, ventral e anal, como é regra nos *Laelaptidae* e em familias proximas, tem a placa anal livre, o que lhes dá uma aparencia androgina. Que não se trata de fato unico já o estabeleceu Oudemans, nos *"Laelaps Studiën"* (11), a proposito de *Laelaps pachypus* Koch, 1839, especie na qual a mesma anomalia é observada.

Na especie em estudo é ás vezes dificil perceber a solução de continuidade da placa holoventral, pois o tegumento, apresentando côr identica à da placa, obscurece os limites lateral e posterior da região. Certas pregas do tegumento contribuem ainda mais para a confusão, pois o aspecto do tegumento aí se torna escamoso, identico, portanto ao da superficie das placas. Só o exame com fortes augmentos permite estabelecer distinção, baseada na estriação do tegumento, que não existe nas placas.

Tritosterno piloso desde o ponto de bifurcação.

Placa esterno-genito-ventral — Mais quitinizada na zona esternal, carateriza-se pela nitidez do reticulado, cujas malhas se assemelham a escamas juxtapostas. A placa emite prolongamentos no intervalo das coxas, sendo as anteriores mais acentuadas. A zona ventral, de limites um tanto imprecisos, estende-se lateralmente até cerca do meio das coxas, achando-se separada da anal por distancia de cerca de 35 μ. Além das cerdas normalmente existentes nesta placa encontram-se ainda varios outros pares de cerdas, dos quais quatro pares na região ven-

tral e dois na zona metaesternal. Na região metaesternal estas cerdas suplementares são muito menores do que as esternais e as metaesternais, medindo cerca de 50 μ o par anterior e 58 μ o posterior, ao passo que as esternais anteriores têm 76 μ, as medias 102 μ, as posteriores 112 μ e as metaesternais 105 μ. O par de cerdas genital mede 95 μ e o posterior da placa 57 μ, tendo as suplementares da região ventral cerca de 45 μ.

Ha vestigios de uma pre-esternal. O orgão masculino faz saliencia no meio do bordo esternal anterior.

Placa anal — De conformação piriforme, mede 95 μ de comprimento por 82 de largura, distando o anus 18 μ do bordo anterior. As cerdas pares ficam para trás do meio do anus, medindo 38 μ. A cerda impar tem 64 μ. A superficie da placa tem reticulo alongado proximo dos bordos.

Placas inguinais — Alongadas, livres, com cerca de 23 μ.

Estigmas ao nivel do intervalo entre as coxas III e IV. *Peritrema* visivel até o meio da coxa II.

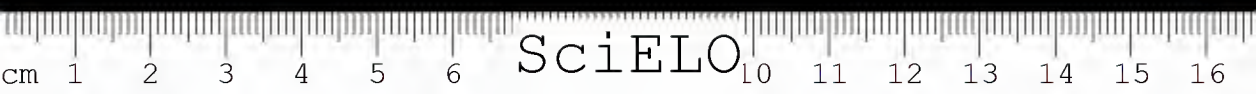
Face dorsal

Escudo dorsal cobrindo quasi totalmente o idiosoma, do qual apenas existe livre estreita faixa lateral, com extremidade anterior afilada. Sua quitinização é media, chegando mesmo a ser fraca nos bordos, cujos limites são pouco nitidos. A superficie é toda reticulada. A quetotaxia do escudo é muito carateristica: normal na zona mais anterior, a pilosidade se torna muito densa para trás, desde o nivel do segundo par de patas, composta de cerdas curtas de cerca de 45 μ, lembrando o aspeto do escudo dorsal de *Eulaelaps vitzthumi* Fonseca. (12). Só as anteriores, laterais e posteriores são mais longas, medindo o par posterior, o mais longo, 106 μ. Logo atrás das cerdas posteriores ha duas marcas circulares refringentes, havendo duas outras iguais mais para frente e para fóra.

Patas

As patas são alargadas, especialmente a pata II.

As coxas têm cerdas relativamente fracas, salvo a posterior da coxa III que é relativamente forte. A coxa II apresenta no bordo anterior um forte aculeo. O genual I tem uma cerda longa e o fémur I duas. O genual II tem duas cerdas longas e o fémur II uma. No tarso II ha alguns espinhos muito fortes, especialmente o distal. No tarso I apenas ha pelos fracos.

O material estudado consta de uma ♀ e tres ♂ ♂ capturados sobre rato silvestre na Provincia de Salta, Republica Argentina, pelo dr. S. Mazza, achando-se os exemplares catalogados sob o No. 604 na coleção de acarianos do Instituto Butantan.

Gnatosoma

Palpos normais.

Epistoma membranoso, de bordo anterior reto, apenas atingindo o primeiro articulo dos palpos.

Labrum lanceolado, fendido no sentido longitudinal, de apice quasi bifido, ligeiramente piloso.

Hipostoma com 6-7 fileiras de denticulos, em geral em numero de 3 pares cada fileira.

Corniculi de quitinização muito fraca.

Mandibulas dificeis de descrever devido á sua retração, em forma de hastes canaliculadas de apice truncado.

5. Lealaps hirsti, sp. n.

(Fig. 8)

Especie grande, pouco quitinizada.

Idiosoma

De contorno eliptico, com espaduas pouco pronunciadas, medindo 920 μ de comprimento por 644 μ de largura ao nivel do 4º par.

Face ventral

Tristosterno piloso após a bifurcação.

Placa esternal bem quitinizada, de superficie reticulada, medindo 200 μ de largura no bordo anterior, excluidos os prolongamentos anteriores, por 145 μ de comprimento na linha mediana. O bordo anterior é reto até o nivel dos prolongamentos, sendo o posterior levemente e os laterais fortemente concavos. Tanto os prolongamentos anteriores, quanto os posteriores são longos, insinuando-se entre as coxas. As cerdas anteriores estão implantadas diretamente no bordo anterior, distando 90 μ uma da outra e tendo 115 μ de comprimento. As medias ficam proximas dos bordos laterais e medem 124 μ. As posteriores têm 220 μ e, como as restantes, são lisas e de apice muito afilado. Além dos dois pares normais de poros, parece haver um outro par menor, imediatamente para frente das cerdas posteriores da placa.

Metaesternais pouco nitidas, com cerdas de 130 μ.

Genito-ventral — Bem quitinizada, larga, medindo cerca de 280 μ de comprimento por 233 μ de maior largura, de superficie percorrida transversalmente por quatro linhas pouco nitidas. As cerdas genitais medem 130 μ, as duas se-

guintes 114 μ e as posteriores 122 μ, sendo todas lisas. O bordo desta placa é espessado desde o nivel do segundo par de cerdas.

Inguinais ovais, alongadas, bem quitinizadas, com 38 μ.

Anal — Esta placa é piriforme, com angulos esculpidos, distando o seu bordo anterior 70 μ do bordo posterior da genito-ventral. Mede 130 μ de comprimento por 114 μ de largura. O anus mede 38 μ e dista 32 μ do bordo anterior. As cerdas pares ficam adiante do nivel do bordo posterior do anus e medem 76 μ; a cerda impar está fraturada no holotipo, dando a marca da sua implantação a quasi certeza de ser mais longa do que as pares, o que, aliás, é regra no genero, exceção feita par *L. exceptionalis* FONS. (1).

Estigmas de localização normal. *Peritrema* visivel até o bordo anterior da coxa II. *Peritrematalia* com prolongamento triangular posterior com poro, fundindo-se na frente á margem do escudo dorsal, que, devido a êsse fato, toma aspeto espessado.

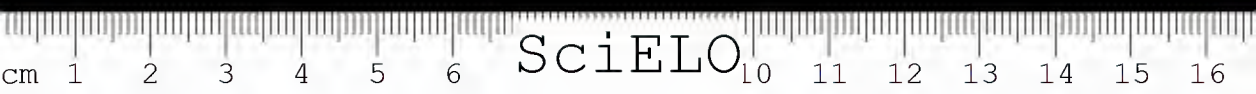
A superficie descoberta da face ventral apresenta ainda cerca de 12 pares de cerdas localizadas na região postero-externa do opistosoma, dos quais o par posterior é o mais longo, medindo 168 μ.

Face dorsal

Escudo do idiosoma eliptico regular, cobrindo quasi toda a superficie, da qual apenas deixa livre estreita faixa lateral e posterior. A sua superficie, toda finamente pontilhada, apenas é reticulada proximo dos bordos, sendo finas e pouco perceptiveis as linhas do reticulo. A superficie apresenta ainda escultura constituida por manchas areolares, mais claras, que vão desde o propodosoma até o histerosoma. As cerdas do escudo são de apice fino e flexivel, havendo treze pares submedianos, incluidos os dois pares da extremidade anterior do escudo; o primeiro e o penultimo são os mais curtos e o posterior é o maior; ha ainda onze pares marginais e quinze entre estes e os submedianos. Marcas circulares de aspeto refringente, identicas ás assinaladas em outras especies, ha dois pares na altura do opistosoma, caraterizados por um ponto claro central. Além do par de poros anteriores ha ainda seis ou sete outros, em geral com forma de fenda. A extremidade anterior do escudo não é tão afilada como em geral sucede ás especies do genero. Todas as cerdas do escudo como as restantes são lisas, não apresentando o farpeado do apice que ocorre em outras especies.

Patas

I e IV são as maiores e II a mais larga.

Coxa I com espinho posterior bastante largo, um pouco maior e mais largo do que a posterior da coxa III, de extremidade romba; cerda distal fraca no bordo posterior, afastada da extremidade.

Coxa II com duas cerdas, ambas distais, a posterior maior; o bordo anterior apresenta denteação e um espinho moderado dorsal.

Coxa III com espinho posterior, cujo aspeto representa uma ligeira redução do da coxa I e cerda anterior encurvada. Coxa IV com cerda fraca distal e mediana. Fémures I e II com uma cerda mais longa cada um. Genual I com uma e genual II com duas cerdas mais longas. Tarso I com pelos finos e os restantes com cerdas espiniformes, mais longas no tarso IV.

Descrição de um exemplar ♀, o holotipo No. 128 da coleção do Instituto Butantan, capturado pelo autor sobre um rato silvestre, *Oryzomys eliurus* Wagner, conhecido pela denominação de "rato do taquaral", a 3.1.35, em Butantan, São Paulo. O hospedeiro estava tambem parasitado por *Ischnolaelaps* sp. e por *Laelaps butantanensis* Fons.

O nome especifico é proposto em homenagem ao grande acareologista Stanley Hirst, do Museu Britanico, ao qual tanto deve este capitulo da parasitologia, e cuja perda prematura é tão lastimavel.

Gnatosoma

Epistoma membranoso, parecendo de extremidade anterior truncada, atingindo o apice do segundo articulo dos palpos.

Mandibulas longas, não espessadas, com coroa de cerdas na base do *digitus mobilis* e pequena cerda na base do *digitus fixus; pilus dentilis* com a metade distal muito afilada; a posição das mandibulas no preparado não permite a descrição dos dentes.

Labrum muito carateristico, em forma de lingua, de extremidade anterior larga em vez de ser triangular ou lanceolada, como na maioria das especies; superficie finamente pilosa.

Paralabra largos, pilosos.

Styli em forma de haste progressivamente afilada.

Malae internae com forma de haste truncada.

Setae maxillicoxales finas.

Setae hipostomatis internae finas e muito mais longas do que as *externae*.

Corniculi de quitinização media.

Palpos normais, com algumas cerdas relativamente grossas na superficie dorsal dos articulos II e III.

6. Laelaps navasi, sp. n.

(Fig. 9)

Especie pequena, de quitinização media, com morfologia tipica do genero.

Idiosoma

Eliptico, com a extremidade anterior ligeiramente afilada, de espaduas pouco pronunciadas, medindo 736 μ de comprimento por 530 μ de largura ao nivel do 4º par. A extremidade posterior apresenta no holotipo leve potuberancia correspondendo à zona do *cribrum* da placa anal.

Face ventral

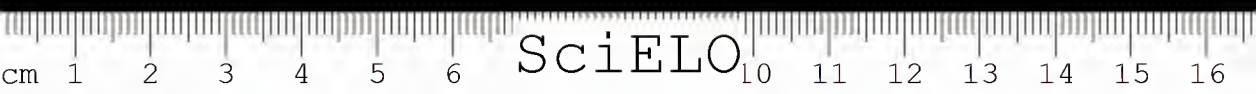
Tritosterno — Só a base e o apice das lascinias, que se apresentam pilosas, são visiveis, estando a parte media alojada na goteira do hipofaringe até a altura das cerdas posteriores do hipostoma.

Placa esternal bem quitinizada, de bordos laterais ligeiramente espessados, com reticulo pouco aparente. Os angulos anteriores formam projeções longas entre as coxas I e II, havendo tambem projeções mais moderadas entre as coxas II e III. O comprimento da placa na linha media é de 110 μ e a largura no bordo anterior, excluidas as projeções, é de 160 μ. Dos bordos o anterior é levemente convexo e muito ligeiramente espessado entre as cerdas anteriores, sendo os laterais e o posterior concavos, este mais fortemente. As cerdas anteriores ficam implantadas diretamente no bordo anterior, distando 64 μ uma da outra, e medem 83 μ de comprimento. As medias são bem mais externas, ainda assim, porém, bem afastadas dos bordos laterais, tendo o mesmo comprimento dos posteriores, isto é, 118 μ. As posteriores têm situação um pouco mais externa do que as medias sem, todavia, alcançar os bordos laterais ou o posterior. Todas as cerdas são largas na base, afilando-se de modo muito regular até o apice, que é finissimo. Os *pori repugnatori* têm a forma e situação habituais, sendo, porém, as suas fendas bem mais largas do que de habito.

Pre-esternal reconhecivel pelo reticulo nitido que vae do bordo anterior da esternal até o tritosterno.

Metaesternais pouco quitinizadas, com cerdas iguais, em comprimento e aspeto, às posteriores da esternal.

Genito-ventral de quitinização um pouco mais fraca do que a da esternal, de expansão normal na zona ventral, medindo cerca de 260 μ de comprimento por 182 μ de largura maxima. A superficie da placa apresenta as quatro linhas transversais encontradas com frequencia em especies do genero, além de linhas longi-

tudinais na zona mais anterior da ventral. As cerdas genitais são submarginais e medem 95 μ; os dois pares medios são marginais e têm 76 μ de comprimento e o posterior tem 84 μ.

Placa inguinal muito mais longa do que larga e mais fina atrás. Dos lados do primeiro par de cerdas da zona ventral da placa ha, no tegumento, duas plaquetas alongadas, à semelhança do que se verifica com frequencia em especies do genero *Liponissus* KOLENATI. Entre este par e a cerda genital ha outro par, este menor, existindo um outro par punctiforme para trás e para fora da plaqueta alongada assinalada em primeiro logar.

Placa anal cordiforme, caraterizada pela convexidade do bordo anterior, medindo cerca de 110 μ de comprimento por 102 μ de maior largura. O orificio anal mede 38 μ, distando a sua extremidade anterior 23 μ do bordo anterior da placa. Cerdas pares com 52 μ, situadas ao nivel do bordo posterior do anus; cerda impar muito mais forte, com 100 μ de comprimento. A superficie da placa apresenta linhas longitudinais proximo dos bordos anterior e laterais e tem escultura nos angulos externos. O *cribrum* vae até adiante da implantação da cerda posterior.

Estigmas na posição habitual.

Peritrema visivel até o meio da coxa II.

Peritrematalia com prolongamento posterior curto e estreito e com um poro na extremidade.

A zona descoberta da face ventral apresenta, de cada lado, cerca de 30 cerdas lisas e curtas, salvo a posterior que é longa, com 120 μ e de apice farpeado.

Face dorsal

Escudo dorsal — Não recobre inteiramente a superficie do idiosoma, deixando livre, a partir do nivel do segundo par de patas, margem de largura progressivamente crescente. A extremidade anterior é levemente acuminada, apresentando os bordos ligeira ondulação, a qual, ao nivel do intervalo entre as coxas I e II, assume proporções de verdadeira reintrancia. O reticulo é mais pronunciado nas proximidades dos bordos, sendo apagado no centro. A metade anterior da zona mediana tem escultura constituida por aureolas mais claras. Marcas em forma de fenda ou circulares existem tambem aos pares; das ultimas ha um par logo à frente das cerdas posteriores e outro marginal, à frente do penultimo par de cerdas. O escudo apresenta numerosas cerdas curtas, com cerca de 50 μ, exceptuados os primeiros pares e o par posterior, que são longos, medindo o ultimo 110 μ. Ha cerca de 18 pares medianos, incluido o grupo anterior. O penultimo par de cerdas medias, localizado logo à frente do par posterior, que se apresenta frequentemente muito reduzido, tem nesta especie o mesmo tamanho da maioria das restantes cerdas. A zona do bordo situada no intervalo entre as cerdas posteriores é reta.

Patas

Patas robustas, parecendo o 3º par um pouco encurtado.

Coxa I com cerda espiniforme forte posterior e uma cerda espiniforme fraca anterior. Coxa II com cerda espiniforme posterior mais fraca do que a posterior da coxa I e cerda encurvada anterior; ha além disso ainda um espinho curto e forte, de apice afilado, no bordo anterior. Coxa III com cerda espiniforme posterior mais fraca do que a da coxa II e pouco mais forte do que a anterior da coxa I e com cerda encurvada anterior. Coxa IV com fina cerda mais proxima do bordo distal e da margem anterior. Genual I com uma cerda longa e genual II com duas do lado dorsal. Fémures I e II com uma cerda mais longa cada um. Tarso I com pelos finos, os restantes com cerdas espiniformes mais longas no tarso IV.

Descrição do holitico ♀, No. 1098, capturado em Butantan, São Paulo, a 7-V-1937, sobre um rato silvestre que vive em bambús, provavelmente *Oryzomys eliurus* Wagner ou *O. flavescens* Thomas, conhecido pelo nome vulgar de "rato do taquaral", pelo auxiliar do Instituto Butantan, sr. José Navas, a quem dedicamos o nome especifico em agradecimento ao grande auxilio que nos tem prestado na coleta de material.

Gnatosoma

Epistoma membranoso, largo, de apice trilobado.

Mandibulas de aspecto normal, com coroa de cerdas no apice do genual, correspondendo ao lado do *digitus mobilis*. Devido à posição das mandibulas não foi possivel verificar a ocorrencia da cerda habitualmente existente nessa extremidade, do lado do *digitus fixus*. Pelo mesmo motivo não foi possivel desenhar a mandibula, que parece apresentar tres dentes no *digitus fixus* e dois no *digitus mobilis*, bem como um *pilus dentilis* não dilatado.

Labrum piloso de apice rombo, triangular.

Paralabra foliaceos, largos, com finos prolongamentos.

Malae internae formando lascinias pilosas.

Setae maxillicoxales iguais em comprimento ás *hypostomatis internae*, apenas ligeiramente mais largas.

Corniculi pouco quitinizados.

Palpos normais.

BIBLIOGRAFIA

1. *Fonseca, F. da* — C. R. XIIe. Congrès Intern. Zoologie 3:1610-1615.1935 *et* Mem. Inst. Butantan, published *in separata* in 1935.
2. *Ewing, H. E.* — Proc. Entom. Soc. Washington 27(1):1-7.1925.
3. *Vitzthum, H.* — Treubia 8(1/2):57-79.1926.
4. *Hirst, S.* — Proc. Zool. Soc. London :825.1926.
5. *Ewing, H. E.* — Manual of External Parasites :184-187.1929.
6. *Ewing, H. E.* — Proc. U. S. Nat. Mus. 82(30):1-9.1933.
7. *Fonseca, F. da* — C. R. XIIe. Congrès Intern. Zoologie 3:1597-1602.1935 *et* Mem. Inst. Butantan, published *in separata* in 1935.
8. *Fonseca, F. da* — *Loc. cit.* :1606-1607 *et* Mem. Inst. Butantan, published *in separata* in 1935.
9. *Fonseca, F. da* — Mem. Inst. Butantan XI: .1938.
10. *Vitzthum, H.* — Zoolog. Jahrb. 60(3/4):405-408.1930.
11. *Oudemans, A. C.* — Tijdschrift voor Entomologie 70:179.1927.
12. *Fonseca, F. da* — Memorias do Instituto Butantan 9:59.1935.

(Trabalho da Secção de Parasitologia e Protozoologia do Instituto Butantan. Dado à publicidade em Junho de 1939).

Fig. 1
Laelaps berlesei, sp. n. ♂

Fig. 2
Laelaps berlesei, sp. n. ♀

Mem. Inst. Butantan
Vol. XII — 1938-39

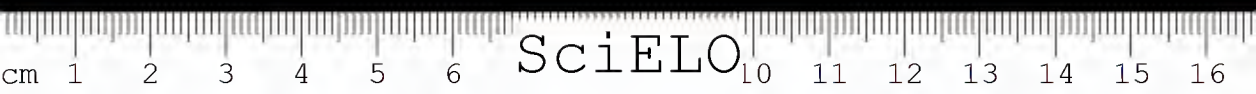
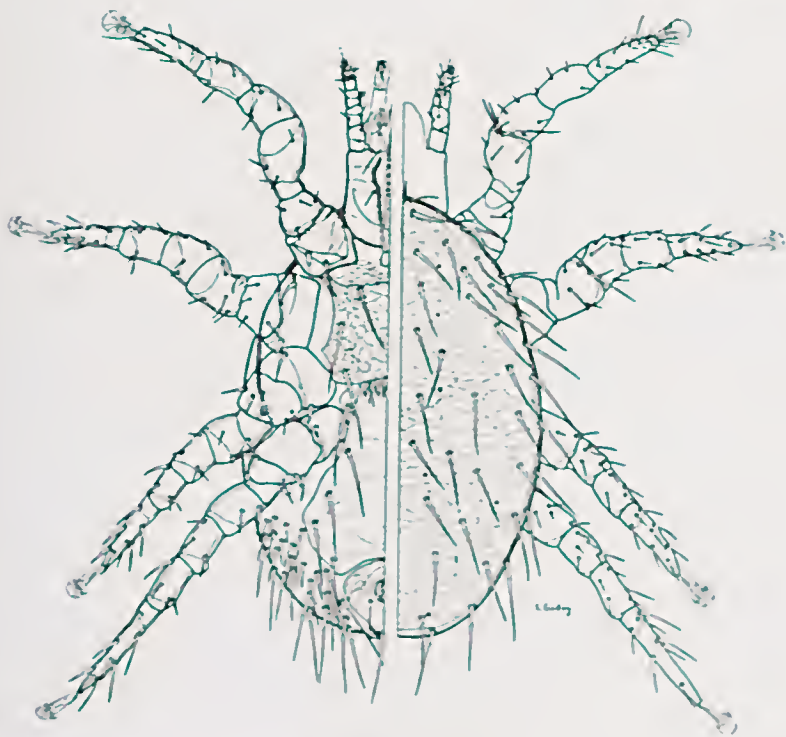
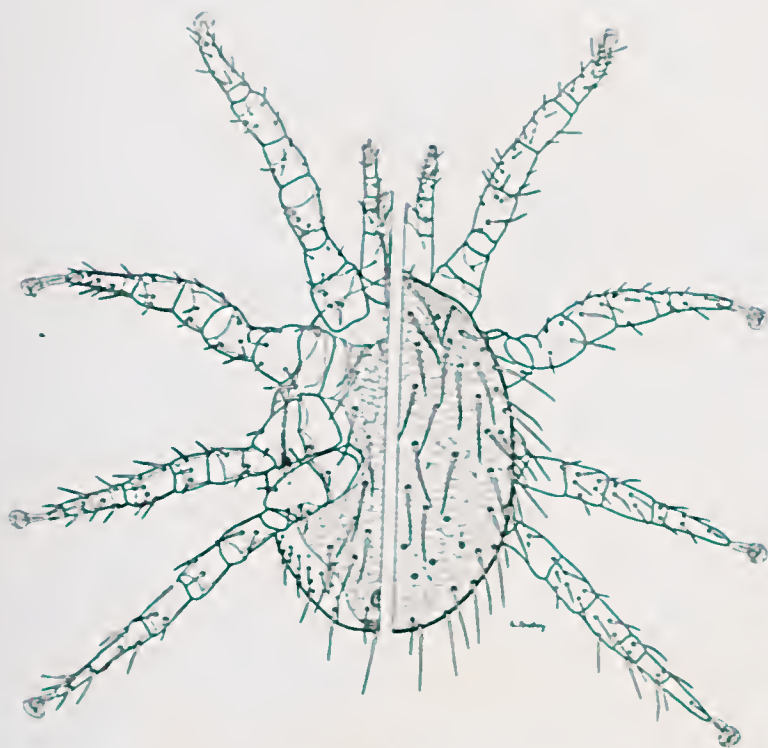
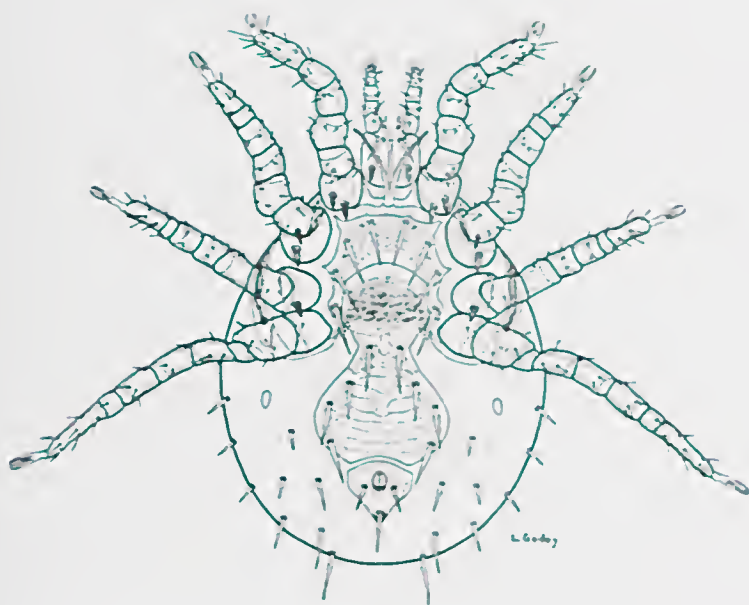



Fig. 3

Laelaps amazonensis, sp. n. Face ventral da ♀.

Fig. 4

Laelaps amazonensis, sp. n. Face dorsal da ♀.

Mem. Inst. Butantan
Vol. XII — 1938-39

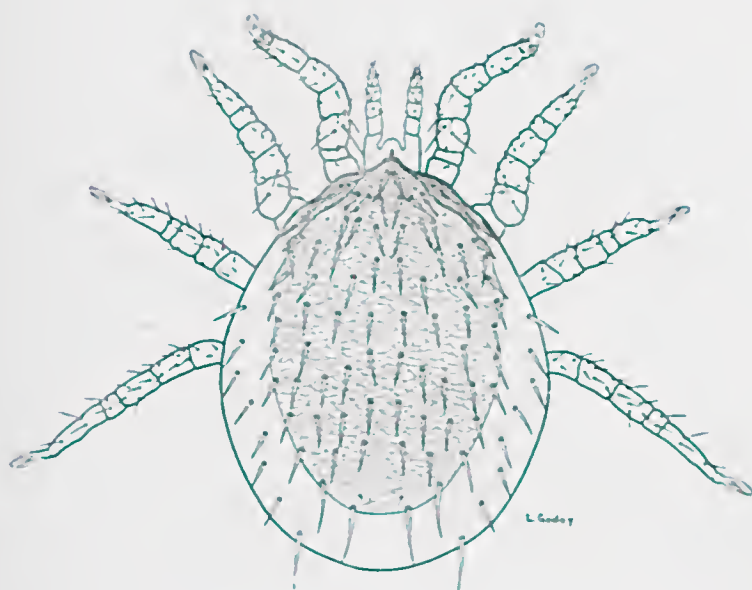
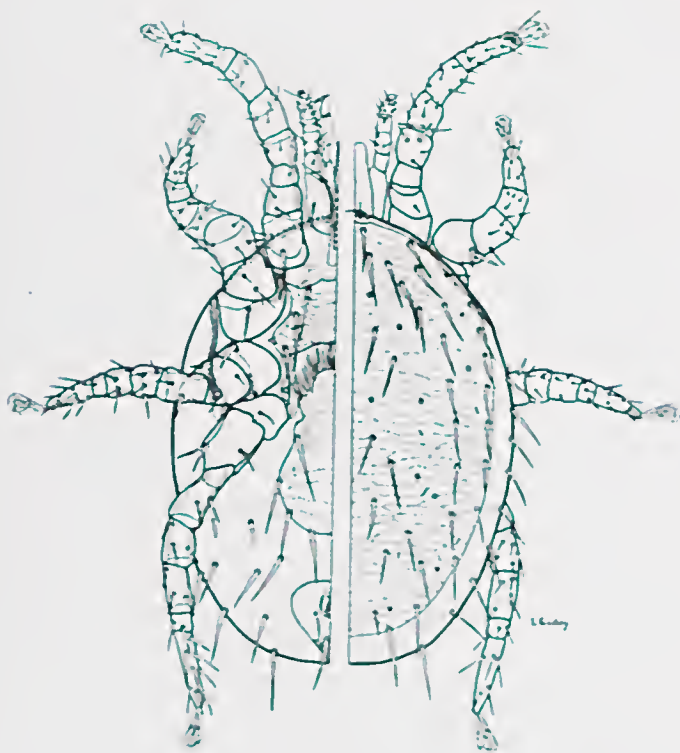



Fig. 5

Laelaps thori, sp. n. ♀

Fig. 6

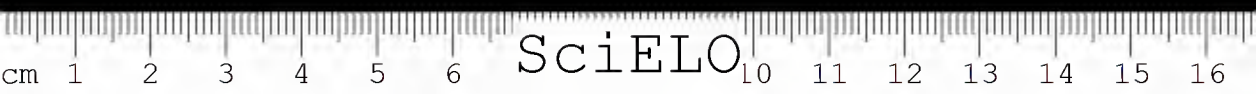
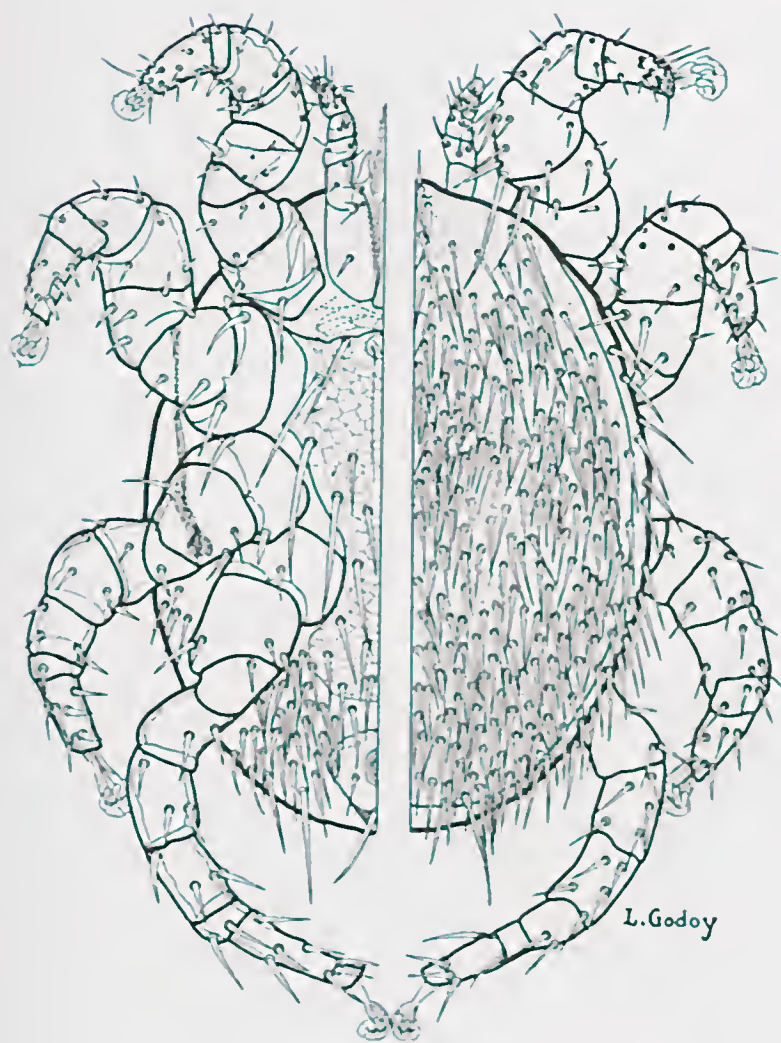
Laelaps mazzai, sp. n. ♀.

Mem. Inst. Butantan
Vol. XII — 1938-39

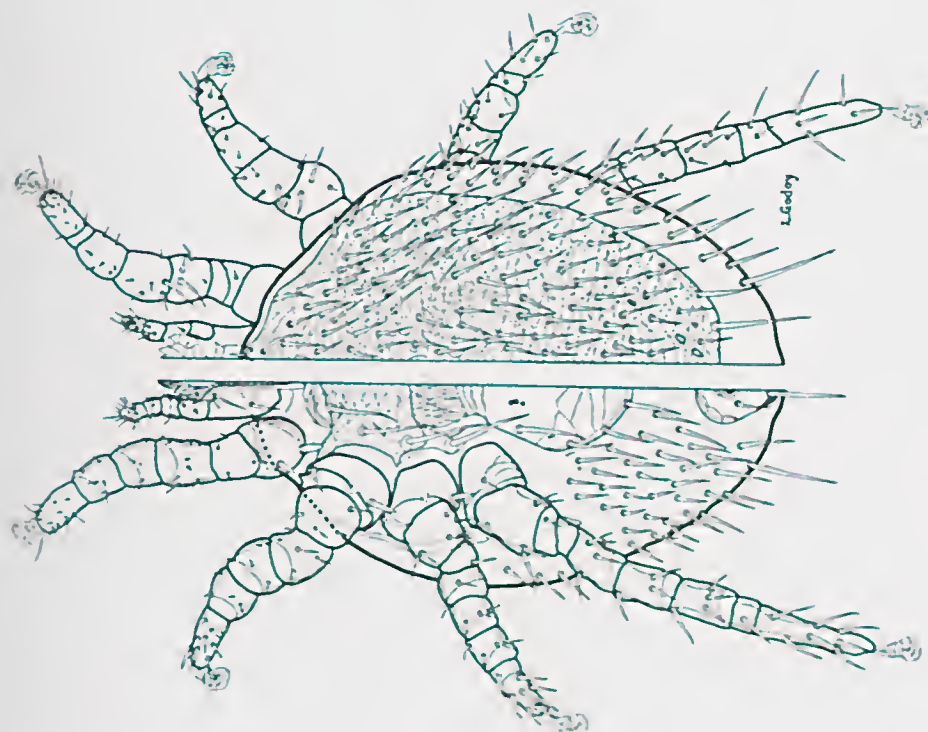
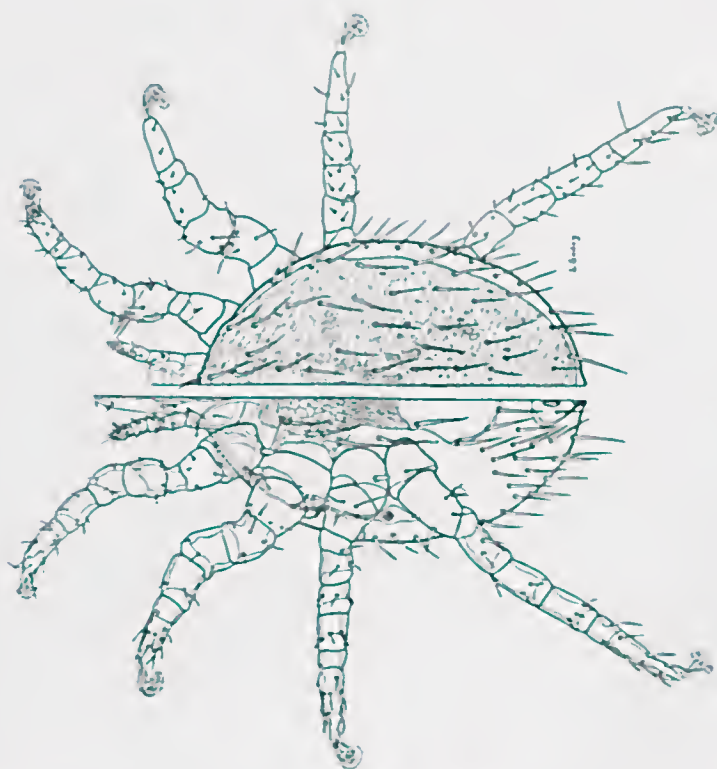
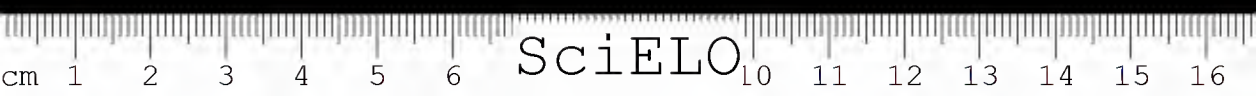
Fig. 7

Laelaps mazzai, sp. n. ♂

Mem. Inst. Butantan
Vol. XII — 1938-39

Fig. 9
Laelaps navasi, sp. n. ♀.

Fig. 8
Laelaps hirsti, sp. n. ♀.

616.968.5:595.42

ACAROLOGICAL NOTES

XXVI. New studies on the genus *Laelaps* KOCH, 1836.

(Acari. Laelaptidae)

BY

FLAVIO da FONSECA

In 1935 there was published the result of a first inspection of the Brazilian fauna of acarians belonging to the genus *Laelaps* KOCH, *sensu strictu* (1).

Should we restrict the conception made of the genus since Berlese's time and accepted up to the end of the first quarter of this century, as shown by the work of Ewing in 1925 (2) and of Count Vitzthum in 1926 (3), the importance of the type genus of *Laelaptidae* would be greatly diminished, as a result of the dispersion, through new genera, which have been proposed by specialists, of a whole series of species, which still recently were included in it and of numerous others yet to be described.

Such a view, however, seems to be entirely contradicted by recent researches on the systematic of this group.

The generic conception restricted by Stanley Hirst in 1926 (4), was also reduced by Vitzthum in the same year (3), limited by Ewing, first in 1929 (5), and more precisely, in 1933 (6). The systematic value became still more restrict in 1935, with the description of the genera *Mysolaelaps* FONS., *Ichnolaelaps* FONS. (7) and *Cavilaelaps* FONS. (8). In spite of these continuous modifications, the diagnosis of the genus *Laelaps* remained, however, broad enough to include, in the first study on the Brazilian fauna, the five new species which were proposed in the mentioned paper (1).

After two more years of collecting acarological material, a new and more accurate incursion in the systematic of the group has become necessary. In spite of the simultaneous description, in another article of this publication (9), of five new species, which, till 1929, before Ewing published the afore mentioned paper, would certainly be included in the genus *Laelaps*, six other species were in plain accordance with the restrict diagnosis admitted nowadays.

Such an abundance of material shows the taxonomic and parasitological importance of the genus under investigation, and justifies the opinion of the great acarologist Count Vitzthum, set forth in the description of *Laelaps jettmani* VITZTHUM, 1930 (10), when he stated that the genus *Laelaps* had not yet been as thoroughly studied as the knowledge would have permitted it, at that time.

If his conception expresses the truth about the acarological fauna of regions which are much better explored, it is still more applicable to the Brazilian regions, where nothing had been done about the systematics of this group until 1935. This belief is based on the impossibility of continuing to include the species *L. brasiliensis* EWING, 1925 in the genus *Laelaps*. In so far as we can infer from the very brief description presented by the author of this species (2), this mite should be included in the genus *Cavilaelaps* FONS., 1935.

In accordance with a systematic and bibliographic revision made while writing this paper, there are about thirty species which should be included in the genus *Laelaps*, as it is known at present. Out of these thirty species, more than the third part (11 autochtone and two cosmopolitan species) were found in Brazil, where, however, the fauna of the Amazon district, doubtless very rich, still remains to be explored.

1. **Laelaps berlesei**, sp. n.

(Figs. 1-2)

Large species for the genus, very weakly chitinized, similar to *Laelaps echidninus* BERLESE, from which it is distinguished principally by the width of the genito-ventral plate, which is, also angulous.

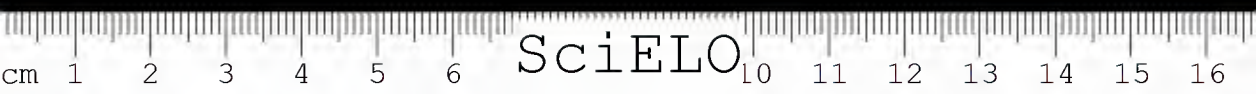
Description of the holotype ♀

(Fig. 1)

Idiosoma

The idiosoma measures 1012 μ in length by 735 μ in width at the level of the fourth pair. The shape is very regularly oval, without the sharpening of the anterior extremity, which, as appointed by Vitzthum, is characteristic of *Laelaps echidninus* BERLESE.

Ventral side — Pilous tritosternum. Sternal plate slightly reticulated, almost square, measuring 243 μ in length by 250 μ in width at the anterior mar-

2

gin (excluding the prolongations) and 281 at the posterior margin. The anterior margin is somewhat projected in the middle; lateral margin straight at the anterior half and curved at the posterior; the posterior margin is slightly concave in the middle. The plate presents conspicuous prolongations between coxae I and II and short ones between II and III. The setae are in a normal position; the posterior are somewhat longer measuring 190 μ; the median 182 μ and the anterior 168 μ. The pores are represented by very narrow slits and have a median dilated point. The reticulation in front of the sternal makes the existence of a pre-sternal possible, this being, however, almost unnoticeable due to the scarce chitinization of the species.

The metasternalia are short, relatively wide and have a seta of 190 μ, exactly in front of the space between the coxae III and IV.

Genito-ventral plate — The genito-ventral plate, weakly chitinized as all the plates of this species, has a very characteristic shape, reminding that of *Laelaps echidninus*. It is, however, easily distinguished from this species, owing to its genital zone, which is much wider, occupying the whole space between the coxae IV and even touching them. Apart from this, the enlargement of the expanded zone begins much more in front than in *L. echidninus*, and far more pronounced than in the better. The lateral margins are also different; they are angulous and undulated. The posterior margin, however, is exactly like that of *L. echidninus* nearly touching the anterior margin of the anal. The surface of the plate is crossed by 4 or 5 transversal sinuous lines, such as in many other species of the genus. The genital setae which are implanted near the margins are flexible and measure more or less 166 μ. The anterior ventral pair is the farthest from the margin. The median ventral pair is placed just behind the angulous point of the margin, showing a circular pore between them at the edge of the plate. The posterior setae are situated just in front of the posterior angle of the plate. The distance between the posterior margin of the genito-ventral and the anterior of the anal is so short, that the two plates seem to touch in the median line, althought the space in this zone does not exceed 2 μ.

Anal plate — Very regularly rounded at the anterior margin and at the angles, measuring 188 μ in length up to the apex of the tubercle of the implantation of the unpaired seta; however, it was not possible to measure it till the *cribrum*, as it follows the curve of the posterior margin of the body. The widest point, at the level of the angles of the plate is practically equal, 186 μ. The anus is 45 μ from the anterior margin and measures 56 μ in length. The paired setae are exactly at the level of the posterior extremity of the anus and measure 102 μ. The unpaired one, which is much stronger, measures 160 μ.

Inguinal plates — Longer than broad, 54 μ in length.

Stigmata at the level of the space between the coxae III and IV. *Peritrema* visible up to the level of the posterior margin of the first pair. *Peritrematalia* elongating posteriorly to the stigmata as it is the rule in this genus.

Dorsal side — Dorsal shield covering the entire idiosoma, weakly chitinized, reticulated, without apparent sculpture, of regular margins, the anterior extremity being narrower, but not as pronounced as in *Laelaps echidninus*.

Apart from these three pairs of anterior setae of the shield, of which the first, projected forwards, is the shortest, measuring 58 μ, and the third the longest, 150 μ, there are 10 other pairs of submedian setae. The hindmost pair is the longest and measures 190 μ. There are two circular spots at the sides of the penultimum pair, which measures 98 μ. Apart from these, there are more or less 60 setae in the shield, almost all smooth, cuts being noticed only in some of them.

Legs

The legs of pair IV are the longest, measuring 1012 μ and the legs of pair II the widest. Coxa I presents a distal spine and a fine proximal seta; coxae II and III with posterior spine and anterior seta curved; coxa IV with small spine-like median seta; the spine of coxa II is somewhat larger and that of coxa III presents a sharper point; the anterior margin of the coxae shows *pecten* with short, setae, more visible in the coxae I and II. Femura of the legs I and II somewhat elongated, with two longer setae. Tarsus I with fine setae and tarsi II, III, IV with some spines, which are stronger and longer in tarsus III.

Gnathosoma

Palps — Measure 220 μ from the first to the fifth joint, the first joint presenting only two ventral setae, the distal of which is long.

Maxillicoxae — With setae of 34 μ.

Rima hypopharingis — With series of 2 or 3 denticles.

Hypostoma — Weakly chitinized, the postero-external setae are the longest, measuring 76 μ.

Corniculi — Weakly chitinized.

Epistoma — Membranous, wide, the anterior margin toothed.

Labrum — Membranous, triangular, pilous at the edges.

Paralabra — Membranous, toothed edges.

Malae internae — Short, longitudinally chamfered.

Styli — In the shape of a stem with curved point.

Mandibulae — Normal, the genual measuring 162 μ in length by 38 μ at the widest point, with *pulvillus* bearing more or less 10 broad setae to the back of the *digitus mobilis* and a small seta at the limiting point with the *digitus fixus*. *Digitus mobilis* 70 μ, with 2 more or less equal teeth. *Digitus fixus* with a seta of 58 μ, presenting three teeth, which are smaller than those of *digitus mobilis*, the median being the largest. *Pilus dentilis* of 20 μ, not inflated.

Description of the ♂

(Fig. 2)

Idiosoma

Slightly chitinized, measuring 845 μ in length by 590 μ in width at the level of the coxa IV, of regular oval shape, without shoulders.

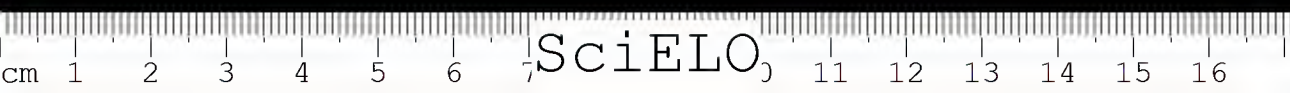
Ventral side — Front margin of the holoventral plate at the level of the anterior margin of coxa II, with distinct reticulation, having a squamous aspect from the sternal region up to the genital. The male organ is projected in the median half at the anterior margin of the sternal region, the anterior setae of the sternal being inserted outside i the same margin. These setae measure 120 μ and are somewhat smaller and weaker than those of the two posterior pairs, which measure 130 and 152 μ respectively. The metasternal setae are equal to the posterior sternal and the genital are equal to the anterior. There are four more pairs of setae in the genito-ventral zone, which is very expanded, surpassing laterally the level of the coxae. There is another seta in the left side of the allotype, the corresponding one at the right side being implanted in the uncovered tegument. The paired anal setae are placed at the level of the posterior margin and measure 76 μ. The unpaired seta measures the double of the paired. The setae of the plates are all smooth, without barbs. The uncovered ventral surface of the opisthosoma presents 12 setae at the external margin, the two posterior of which are much longer, all with barbs.

There are traces of a pre-sternal characterized by transversal striation.

Tritosternum with pilous *lasciniae* from the base.

Stigmata at the level of the space betwen the coxae III and IV, the *peritrematalia* prolonging backwards and to the front up to the anterior extremity of the idiosoma.

Dorsal side

Dorsal shield — Covering the whole idiosoma, with distinct reticulation, apparently without sculpture, with the anterior extremity somewhat pointed. It

bears 12 paires of submedian setae and more or less 50 others between these and the lateral margins, all being smooth and relatively long and flexible.

Legs

Legs I and IV are the largest and leg II the shortest and the widest. Coxae I and II with two weak setae coxa III with curved anterior seta and spine-like short posterior seta; coxa IV with a single seta, smaller and finer than those of the other coxae. Femura of the legs I and II with two setae, which are somewhat longer than the others. The pilosity is more developed in the more posterior tarsi.

Type material — A ♀ holotype and a ♂ allotype, mounted on one slide, No. 147 in our collection. Both specimens were captured by the author on a *Gallictis vittata* in Butantan, S. Paulo, on 26.8.1935. The same host was also parasited by a *Liponissus* sp.

Gnathosoma

Epistoma membranous, divided in three *laminae* of rounded apex.

Mandibulae impossible to describe due to its retraction.

Labrum wide, pointed at the apex, slightly pilous and longitudinally striated.

Palps normal.

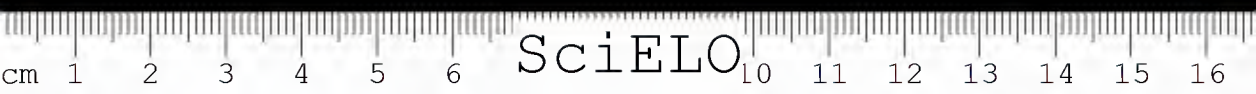
2. **Laelaps aragonensis**, sp. n.

(Figs. 3-4)

A very characteristic and interesting species, due to the large development of setae, which are usually slender in the other species of this genus, reminding the choetotaxy of the genus *Neolaelaps* Hirst, from which it is distinguished by the existence of four setae in the genito-ventral plate.

Description of the ♀

Idiosoma

Species of median size, the idiosoma measuring 700 μ in length by about 500 μ in width at the level of the fourth pair of legs. The chitinization is median.

Ventral side (Fig. 3).

Tritosternum wide, filamentous from the point of bifurcation of the *laciniae*, which reach the apex of the *corniculi*.

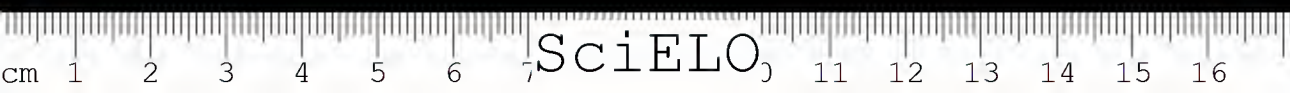
Sternal plate much wider than long, measuring 83 μ in length at the median line by 167 μ in width at the level of the anterior prolongations and 228 μ at the level of the posterior. Its anterior margin is slightly convex, presenting in the external angles the usual prolongations, which are hardly visible between the coxae I and II; the posterior margin is very concave, the median part being placed at the level of the middle of the coxa II and the posterior extremities at the level of the middle of coxa III. The surface of the plate is clearly reticulated, presenting the two pairs of pores in form of slits in the usual position. In the surface three pairs of setae are implanted, which are very characteristic as they are broad at a short distance from the point of implantation, sharpening slowly and progressively up to the apex, which is very pointed and flexible. The anterior and the median pairs are equal, measuring 90 μ in length and the posterior, somewhat larger, more or less 100 μ.

A slight reticulation of the anterior tegument seems to indicate the existence of a pre-sternal plate.

Metasternal plate elongating from the sternal to the space between the coxae III and IV, with a pair of setae, which is equal to the sternal one.

Genito-ventral plate — Very characteristic, with large posterior expansion elongating near the anal, similary to what is seen in other species of the genus, such as *L. echidninus* BERLESE, *L. lativentralis* FONS., and *L. berlesei*, sp. n. The widest point of this plate measures 235 μ, a little behind the third pair of setae. Its external margin is very convex and the posterior very concave, surrounding the anterior margin of the anal, of which it is separated from the median line by a space of more or less 5 μ. Its surface is crossed by 10 transversal lines, of which the four posterior are of anterior concavity, the fifth more or less straight and the five anterior ones of posterior concavity. The four setae of this plate are just alike the sternal; the three anterior measure 80 μ and the posterior 95 μ, being implanted a at certain distance from the margins of the plate; the posterior seta at 58 μ in front of the posterior angle of the plate and at the same distance from the third pair.

Inguinalia 28 μ in length, ovoid, with large antero-posterior axle.

Anal plate — Triangular, anterior margin convex, adapted to the concavity of the posterior margin of the genito-ventral, reticulated surface, anus at 34 μ to 18 μ from the anterior margin. Paired setae with 42 μ, implanted somewhat behind the level of the middle of the anus and at equal distance from this and from the external margin of the plate. Posterior seta with 70 μ. *Cribrum* rising at the edges somewhat beyond the level of the insertion of the posterior seta.

Stigmata at the level of the space between the coxae III and IV. *Peritrema* extending to the dorsal side, at the level of coxa II and visible up to the level of coxa I. *Peritrematalia* distinct with a small pore behind the stigmata, extending to the dorsal plate where they join the dorsal shield.

Uncovered surface of the ventral side almost naked, presenting only 6 setae on each side, the posterior of which are the longest.

Dorsal side (Fig. 4) — Partially covered by the dorsal shield, which, in the median and lateral zone of the idiosoma, leaves a wide stripe uncovered with some setae like those of the shield.

Dorsal shield — Elliptic, margins slightly undulated in the centre, surface reticulated. It bears eleven pairs of submedian setae, the anterior of which pointing forwards measures about 25 μ and the others up to the 9th pair about 60 μ; the 10th pair is very small, measuring only 12 μ and the 11th is the largest, measuring about 105 μ; the other setae of the shield, about sixty, all of large proximal extremity and very sharp distal extremity, measure from 52 to 65 μ, excepting, the last marginal pairs, which are larger. The anterior zone of the shield is heavily chitinized and is a result of fusion with the *peritrematalia* in its anterior position.

Legs

The legs of pair IV are longer and slender, those of pair II shorter and wider.

The coxae of pair I present two equal very strong spines; the coxae of pair II show a posterior spine and a curved and strong anterior seta; the coxae of pair III present a posterior spine and an anterior seta, both smaller than those of pair II; in the median part of the coxae of pair IV, there is a single small and very thin seta, contrasting with those of the anterior pairs.

The femura of legs I and II present two setae which are somewhat longer.

Cotypes — Two female specimens, No. 905 in the collection of the Instituto Butantan, caught by R. M. Gilmore on "rat", in Anapolis, State of Goiás, and sent to the author by dr. H. de Beaurepaire Aragão, to whom this species is dedicated.

Gnathosoma

As the greatest part of the pieces of the gnathosoma is hardly visible, it is not possible to present a complete description.

Maxillicoxae — Characterized by the transformation of the setae in very strong spines, identical to those of the coxae; this fact makes it easy to recognize the species, its aspect recalling that of *Neolaelaps magnistigmatus*

(Vitzthum) (*loc. cit.*). The postero-internal setae of the hypostoma are also typical, that is, very long and broad, contrasting with the postero-external and the anterior of the hypostoma.

3. **Laelaps thori,** sp. n.

(Fig. 5)

Small species, weakly chitinized and with elliptic contour.

Idiosoma

Idiosoma 810 μ in length by 530 μ in width at the level of coxa IV. There are no pronounced shoulders and the pointing of the anterior extremity is not very sharp.

Ventral side

Sternal plate — Reticulated only near the anterior and lateral margins, its central zone is pointed and measures 150 μ in width at the anterior margin, excluding the prolongations between the coxae I and II, and 200 μ at the posterior margin, excluding the prolongations between coxae II and III. Its length, at the median line, is 105 μ. The anterior margin is somewhat protuded in the zone between the paired setae. The lateral and the posterior margins are very concave. The anterior setae are implanted in the anterior margin and 58 μ separated from each other. The median and the posterior are placed far from the lateral and posterior margins. The length and width of the setae increase progressively, the posterior being the largest: they measure respectively 76, 95 and 106 μ.

The metasternal plates are elongated, joining the posterior margin of the sternal plate. Their setae were fractured in the holotype.

The genito-ventral plate measures about 210 μ in length by 170 μ at the widest point at the level of the second pair of setae. It is somewhat expanded and its posterior contour is regularly circular. The ventral zones is crossed by four transversal lines, the two anterior of which are of posterior concavity and the posterior of anterior concavity, the following being almost straight. The pairs of genital and posterior setae measure 95 μ, the others are somewhat smaller. The four pairs are inserted directly in the margins of the plate, pointing backwards.

Anal plate — 80 μ distant from the posterior margin of the genito-ventral plate, of triangular contour, measuring 115 μ in length and at the widest point. The anus measures 38 μ and is 20 μ distant from the anterior margin. The

paired setae, in front of the level of the posterior extrtemity of the anus, measure 45 μ in length, the unpaired one 95 μ. The surface of the plate is reticulated at the margins. The angles are rounded and the anterior margin is almost straight.

Inguinal plates elongated, very narrow, about 45 μ to 10 μ.

Tritosternum with pilous *lasciniae*.

Stigmata at the level of the space between the pairs III and IV.

Peritrema comparatively wide, visible up to coxa I.

Peritrematalia prolonging in triangular shape behind the stigmata, visible till the anterior extremity of the idiosoma, fused with the dorsal shield, at the level of the first pair of legs.

Dorsal side

Dorsal shield ending near the posterior extremity of the body, leaving a narrow stripe uncovered, from the heigth of the second pair up to the posterior extremity. The surface is reticulated and slightly sculptured anteriorly. There are thirteen pairs of submedian setae, including the vertical and excluding the posterior pair, and twelve marginal pairs. The submedian pair, which lies next to the posterior margin, is smaller, measuring 50 μ; the posterior marginal pair is the longest, measuring 98 μ. To the outside of the last submedian pair and to the back of and inside of the 10th marginal pair, there are two circular refractive marks.

Legs

The first and the fourth pair are the longest and the second the widest. Coxae without spines. Femura of the first and second pair with two setae somewhat stronger than the others. Tarsus with setae increasing in length and strength from the first to the fourth pair.

Description made from a holotype ♀, No. 1011 in the collection of the Instituto Butantan, without data on either locality or host. The material is certainly Brazilian. This species is dedicated to the great northern acarologist Sig Thor.

Gnathosoma

Normal palps.

The setae of the *maxillicoxae* are comparatively short, measuring only 22 μ, whereas the postero-internal of the hypostoma measure 50 μ.

Labrum lamellar, comparatively narrow, of toothed margins.

Mandibulae of normal aspect, with crown of setae in the *pulvilli*. *Pilus dentilis* not dilated in the *digitus fixus*. Other structures of the gnathosoma impossible to describe in the holotype.

4. **Laelaps mazzai,** sp n.

Figs. 6 — 7

Comparatively small, wide and robust species, the ♀ is well chitinized.

Description of the ♀

(Fig. 6)

Idiosoma

It measures 700 μ in length by 550 μ in width at the level of the fourth pair; very pronounced shoulders; anterior extremity sharpened.

Ventral side

Tritosternum wide at the base, with very transparent *lasciniae*, which are hardly visible in the holotype.

Sternal plate — Wider than long, with sharp prolongations between the coxae I and II and slight prolongations beetween coxae II and III. Measures 170 μ in width at the level of the anterior margin, excluding the prolongations, and 195 μ at the level of the posterior, measuring only 98 μ in length at the median line. Its surface presents reticulation which is hardly noticeable. The straight anterior margin is slightly and the posterior strongly thickened and somewhat concave. The anterior setae, measuring 85 μ, are implanted at the level of the anterior margin, and separated from each other by a space of 60 μ; the median measure 125 μ in length and are about 12 μ distant from the lateral margin; the posterior are placed at the posterior angles and measure 136 μ.

The reticulation of the surface from the anterior margin of the sternal up to the tritosternum indicates the presence of a pre-sternal plate.

Metasternalia elongated, weakly chitinized with setae of about 135 μ.

Genito-ventral plate comparatively short and wide, measuring about 200 μ in length by 160 μ at the widest point. There are four pairs of setae, the genital with 105 μ and the posterior with 72 μ, the other two being fractured in the holotype. The surface of the plate is crossed by four transversal lines, the anterior of which is very concave backwards and the two posterior slightly concave forewards.

Anal-plate — Piriform, 105 μ distant from the posterior margin of the genito-ventral plate, measuring 105 μ in length by 88 μ at the widest point. The anus measures 30 μ and is 15 μ distant from the anterior margin of the plate. The paired setae are placed at the level of the posterior margin of the anus and

fractured just like the unpaired one; the latter, however, according to the mark of implantation, is supposed to be much larger than the paired ones. The lateral angles of the plate are rounded and much more heavily chitinized, as is the case in several other species.

Inguinal plates elliptic, very regular, with large antero-posterior axle, about 30 μ in length.

The uncovered surface of the ventral side bears about 50 setae which increase in length posteriorly, the posterior pair, which is the largest, measuring 115 μ; all smooth, only the larger presenting slight roughness.

Stigmata at the level of the space between the coxae III and IV.

Peritrema passing on to the lateral margin at the level of the second pair.

Dorsal side

Dorsal shield with undulated margins, corresponding to the widening of the shoulders of the idiosoma, very sharpened at the anterior extremity, with elongated reticulation at the level of the anterior zone of the margins, which is more heavily chitinized. The remaining surface of the shield also shows reticulation always more pronounced behind the setae, where the line has the shape of a V, surrounding from the posterior concavity the point of implantation of the seta. The shield leaves a wide edge laterally and posteriorly uncovered, the posterior margin being straight between the setae of the last pair. The setae are more numerous than usually, principally at the anterior third of the shield; there are 16-18 submedian pairs including the vertical one. The longest setae are flexible, like the third submedian pair, which is also the widest.

There are some circular symmetric marks on the surface of the shield, two being marginal posterior pairs. There are also several pairs of slit-like pores. There are more or less twelve marginal setae on each side; the posterior, which are broken in the holotype, seem, by the marks of implantation, to be very long and strong. All the setae of the shield are smooth. There is an anterior aerolated sculpture.

The uncovered dorsal surface has about twenty setae on each side, the posterior pairs being larger.

Legs

Leg II slightly elongated, just like the genual I. Posterior setae of the coxae I, II and III spine-like, wide, that of coxa II being larger. Distal seta of the coxa I implanted almost in the middle of the posterior margin of the joint. Coxa IV with a very weak seta, near the distal margin and approaching the anterior rather than the posterior margin. Femur I has a long seta and the genual I two long setae. Femur II has two long setae and the genual II one. Tarsus III presents the strongest setae and IV the longest.

Gnathosoma

Normal palps.

Epistoma membranous, of foliaceous aspect in the apex.

Mandibulae retracted in the holotype, therefore not described. The *pilus dentilis* not dilated.

Labrum lanceolated, with reduced pilosity.

Corniculi slightly chitinized.

Seta of the *maxillicoxae* and of the hypostoma normal.

Description of the ♂

(Fig. 7)

Our material consists of an unique female, the holotype, and three male specimens, on which the description was based. The fact that these male specimens were caugth at the same time as the female and on the same host, which was not parasited by any other species of the same genus or of a similar genus, in itself leads to the supposition that they belong to the same species. It this case, the hypothesis is still strengthened by arguments of morphologic homology, such as the tendency to hypertrichosis in the dorsal shield in both sexes and the resemblance of aspect of certain setae.

Idiosoma

Of elliptic shape, anterior extremity slightly sharpened. The chitinization is median. It measures 552 μ in length by 420 μ in width at the level of the third pair.

Ventral side

The males of this species are very characteristic due to the aspect of the ventral side; instead of presenting the holoventral shield, a result of the fusion of the sternal, genito ventral and anal plates, as is the rule in the *Laelaptidae* and in similar families, they bear a free anal plate which gives them an androgyne appearence. That this is not an unique case, was already shown by Oudemans, in the *Laelaps* Studiën (11), concerning *Laelaps pachypus* Koch, 1839, a species in which the same anomaly of the plates was observed.

Tritosternum pilous from the point of bifurcation.

Sternal-genito-ventral plate — More chitinized in the sternal zone, characterized by the clearness of the reticulation, the mashes of which are scale-like.

The plate emits prolongations into the interval of the coxae, the anterior being the more pronounced. The ventral zone, of indistinct limits, extends laterally up to about the middle of the coxae, being 35 μ distant from the anal plate. Apart from the setae, which are normally found in this plate, there are several others, four pairs being in the ventral region and two in the metasternal zone. The supplementary setae are, in the metasternal region, much smaller than the sternal and the metasternal, the anterior pair measuring 50 μ and the posterior 58 μ, whereas the anterior sternal measures 76 μ. the median 102 μ, the posterior 112 μ, and the metasternal 105 μ. The pair of genital setae measures 95 μ, the posterior of the plate 57 μ and the supplementary of the ventral region measures about 45 μ.

There are traces of a pre-sternal plate. The male organ projects into the middle of the anterior sternal margin.

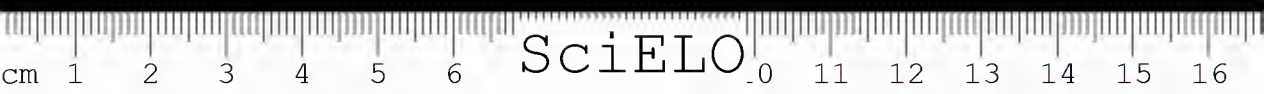
Anal plate — Of piriform shape, measures 95 μ in length by 82 μ in width, the anus being 18 μ distant from the anterior margin. The paired setae are behind the middle of the anus, and measure 38 μ. The unpaired seta measures 64 μ. The surface of the plate presents an elongated reticulation near the margins.

In some specimens the intensive dark coloration of the integument in this region raises difficulties in tracing the lateral and posterior limits of this plate. The androgyne aspect is also marked by folds of the integument that is very similar to the scale-like aspect of the ventral plates. Only the examination with high magnification permits to observe the characteristic striation of the integument that is absent in the plates.

Inguinalia — Elongated, free, about 23 μ.

Stigmata — At the level of the space between the coxae III and IV. *Peritrema* visible up to middle of the coxa II.

Dorsal side

Dorsal shield — Covering amost the whole idiosoma, leaving only a narrow lateral stripe free, anterior extremity sharp. The chitinization is median, being weak at the margins, the limits of which are not very distinct. The surface is all reticulated. The choetotaxy of the shield is very characteristic; normal at the anterior zone, the pilosity becomes more dense backwards from the level of the selond pair of legs formed by short setae of about 45 μ, recalling the aspect of the dorsal shield of *Eulalaeps vitzthumi* Fons.. Only the anterior, lateral and posterior are longer; the posterior pair, being the longest, measures 106 μ. There are two circular refractive marks immediately behind the posterior setae and two other equal ones more forwards and outwards.

Legs

The legs are enlarged, especially leg II.

The coxae have comparatively weak setae, excepting the posterior of coxa III, which is comparatively strong. The coxa II presents a strong sting in the anterior margin. The genual I presents one and femur I two long setae. The genual II has two and the femur II one long seta. In tarsus II there are some spines, which are very strong, specially the distal one. In tarsus I there are only weak hairs.

The material under investigation consists of a ♀ and three ♂♂, caught on a wild rat in the Provincia de Salta, Argentine Republic, by Dr. S. Mazza, the specimens being catalogued under No. 604 in the collection of acarians of the Instituto Butantan, S. Paulo.

Gnathosoma

Normal palps.

Epistoma membranous, anterior margin straight, touching only the first joint of the palps.

Labrum lanceolated, cut longitudinally, almost bifid apex, slightly pilous.

Hypostoma with 6-7 lines of denticles, usually with 3 pairs in each line.

Corniculi with very weak chitinization.

Mandibulae difficult to describe, owing to the retraction, in shape of canaliculated stems with truncated apex.

5. **Laelaps hirsti**, sp. n.

(Fig. 8)

Large species, weakly chitinized.

Idiosoma

Of elliptic contour, shoulders slightly pronounced, measuring 920 μ in length by 644 μ in width at the level of the fourth pair.

Ventral side

Tritosternum pilous after the bifurcation.

Sternal plate — Well chitinized, of reticulated surface, measuring 200 μ in width at the anterior margin, excluding the anterior prolongation, by 145 μ in

lenght at the median line. The anterior margin is straight up to the level of the prolongations, the posterior being slightly and the lateral strongly concave. The anterior prolongations such as the posterior are long, projecting between the coxae. The anterior setae are implanted directly at the anterior margin, being 90 μ distant from each other, and 115 μ in length. The median are near the lateral margins and measure 124 μ. The posterior measure 220 μ and as the other they are smooth and with very sharp apex. Apart from the two normal pairs of pores, there seems to be another smaller pair, immediately in front of the posterior setae of the plate.

Metasternalia not very distinct, with setae of 130 μ.

Genito-ventral plate — Well chitinized, wide, measuring about 280 μ in length by 288 μ at the widest point. The surface is cut transversally by four not very distinct lines. The genital setae measure 130 μ, the two following 114 μ and the posterior 122 μ, all being smooth. The margin of this plate is thickened from the level of the second pair of setae.

Inguinalia — Oval, elongated, well chitinized, with 38 μ.

Anal plate — This plate is piriform, with sculptured angles, the anterior margin being 70 μ distant from the posterior margin of the genito-ventral plate. It measures 130 μ in length by 114 μ in width. The anus measures 38 μ and is 32 μ distant from the anterior margin. The paired setae in front of the level of the posterior margin of the anus measure 76 μ; the unpaired seta is fractured in the holotype, however, its mark of implantation indicates as almost certain that it is longer than the paired ones, this being a rule in the genus, excepting *L. exceptionalis* Foxs..

Stigmata of normal position. *Peritrema* visible up to the anterior margin of coxa II. *Peritrematalia* with triangular posterior prolongation with pore, joining in front to the margin of the dorsal shield, which, therefore, seems thickened.

The uncovered surface of the ventral side shows about twelve pairs of setae in the postero-external region of the opisthosoma, the posterior pair, the longest, measuring 168 μ.

Dorsal side

Shield of the idiosoma regularly elliptic, covering almost the entire surface, of which it leaves only a narrow lateral and posterior stripe free. The surface, all over covered with fine points, is reticulated only near the margins, the lines of the reticulation being fine and hardly noticeable. The surface presents also a sculpture, consisting of lighter areolated spots from the propodosoma up to the hysterosoma. The setae of the shield present a fine and flexible apex, there being thirteen submedian pairs, including the two pairs of the anterior extremity of the shield, the first and the penultimum being shorter and the posterior larger; there are also eleven marginal pairs and fifteen between these and the submedian ones

There are two pair of circular marks of refractive, identical to those mentioned in other species, at the heigth of the opisthosoma, characterized by a light central point. Apart from the anterior pair of pores there are also six or seven others, generally slit-shaped. The anterior extremity of the shield is not as sharp as is the rule in the genus. All the setae of the shield as well as the others are smooth, not being indented in the apex as it occurs in other species.

Legs

Legs I and IV are the largest and II the widest.

Coxa I with posterior spine very wide, somewhat larger and wider than the posterior of coxa III, of rounded ertremity; distal seta weak at the posterior margin, distant from the extremity.

Coxa II with two setae, both distal, the posterior larger, the anterior margin is toothed and shows a moderate dorsal spine.

Coxa III with posterior spine, somewhat smaller than that of coxa I and anterior seta curved. Coxa IV with weak distal and median seta. Femura I and II each with one longer seta. Genual I with one and genual II with two longer setae. Tarsus I with fine hairs and the rest with spine-like setae, which are longer in tarsus IV.

Description of a female specimen, the holotype, No. 128 in the collection of the Instituto Butantan, caught by the author on a wild rat *Oryzomys eliurus* WAGNER, known by the common name "rato do taquaral", on 3-1-35 at Butantan, São Paulo. On the same host were found *Ischnolaelaps* sp. and *Laelaps butantanensis* FONS..

Gnathosoma

Epistoma membranous, anterior extremity seeming to be truncated, touching the apex of the second joint of the palps.

Mandibulae long, not thickened, with crown of setae at the base of the *digitus mobilis* and small seta at the base of the *digitus fixus; pilus dentilis* with the distal half very sharp; the position of the *mandibulae* in the preparation did not permit a description of the teeth.

Labrum very characteristic, shaped like a tongue with anterior extremity wide instead of triangular or lanceolated, as in the majority of the species; surface slightly pilous.

Paralabra wide, pilous.

Styli in the shape of a progressively sharpening stem.

Malae internae in the shape of a truncated stem.

Setae maxillicoxales thin.

Setae hypostomatis internae thin and much longer than the external ones.

Corniculi of median chitinization.

Palps normal, with some comparatively thick setae on the dorsal surface of joints II and III.

6. **Laelaps navasi**, sp. n.

(Fig. 9)

Small species, median chitinization, with the typical morphology of the genus.

Idiosoma

Elliptic, anterior extremity slightly sharpened, shoulders somewhat pronounced, measuring 736 μ in length by 530 μ in width at the level of the fourth pair. In the holotype, the posterior extremity presents a slight protuberance, corresponding to the zone of the *cribrum* of the anal plate.

Ventral side

Tritosternum — Visible only at the base of the apex of the *lasciniae* which are pilous, the median part at the *rima hypopharyngis* up to the height of the posterior setae of the hypostoma.

Sternal plate — Well chitinized, lateral margins slightly thickened, reticulation hardly noticeable. The anterior angles form long projections between the coxae I and II, there existing smaller projections between the coxae II and III. The length of the plate at the median line is 110 μ and the width at the anterior margin, excluding the projections, 160 μ. The anterior margin is slightly convex and somewhat thickened between the anterior setae, the lateral and the posterior being concave, the latter more strongly. The anterior setae are implanted directly at the anterior margin, being 64 μ distant one from the other, and measure 83 μ in length. The median are much more external, but still very far from the lateral margins. The length is the same as that of the posterior, i.ẽ., 118 μ. The posterior are of somewhat more external position than the median, yet not touching the lateral or the posterior margins. All the setae are wide at the base and sharpen regularly up to apex, which is very thin. The *pori repugnatori* have the usual position and shape, its slits being, however, much wider than usual.

Pre-sternal plate — Recognizable by the distinct reticulation from the anterior margin of the sternal up to the *tritosternum*.

Metasternalia weakly chitinized, with setae of equal length and aspect as the posterior ones of the sternal plate.

Genito-ventral plate — Chitinization somewhat more weak than that of the sternal plate, of normal expansion in the ventral zone, measuring about 260 μ in length by 182 μ at the widest point. The surface of the plate presents four transversal lines, which are usualy found in species of the genus, apart from longitudinal lines in the most anterior zone of the ventral plate. The genital setae are submarginal and measure 95 μ; the two median pairs are marginal and measure 76 μ in length and the posterior 84 μ.

Inguinal plates — Much longer than wide and thinner at the back. At the sides of the first pair of setae of the ventral zone of the plate, there are, in the tegument, two small elongated plates, as they often appear in species of the genus *Liponissus* KOLENATI. Between this pair and the genital seta there is another smaller pair; still another punctiform pair being placed back and outwards of the small elongated plate first mentioned.

Anal plate — Cordiform, characterized by the convexity of the anterior margin, measuring about 110 μ in length by 102 μ at the widest point. The anal orifice measures 38 μ, the anterior extremity being 23 μ distant from the anterior margin of the plate. Paired setae with 52 μ, at the level of the posterior margin of the anus; unpaired seta much stronger, 100 μ in length. The surface of the plate presents longitudinal lines near the anterior and lateral margin and sculpture in the external angles. The *cribrum* goes even beyond the implantation of the posterior seta.

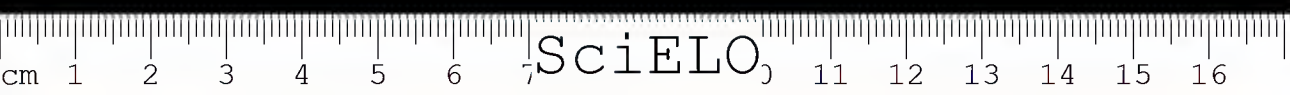
Stigmata with the usual position.

Peritrema visible up to the middle of coxa II.

Peritrematalia with short and narrow posterior prolongation and one pore at the extremity.

The uncovered zone of the ventral plate presents on each side about 30 setae, which are smooth and short, excepting, however, the posterior, which is long with 120 μ, and of toothed apex.

Dorsal side

Dorsal shield — It does not cover the whole surface of the idiosoma, leaving free, from the level of the second pair of legs, a margin which increases progressively. The anterior extremity is slightly pointed, presenting a slight undulation at the edges, which, at the level of the space between the coxae I and II, assumes proportions of real reentrance. The reticulation is more pronounced near the margins, finishing in the centre. The anterior half of the median zone is

sculptured by lighter halos. Paired circular or marks also exist slit-shaped; of the latter there is a pair directly in front of the posterior setae and another marginal in front of the penultimum pair of setae. The shield presents numerous short setae, about 50 μ, excepting the first median pair and the posterior ones, which are long, the last measuring 110 μ. There are about 18 median pairs, including the anterior group. The penultimum pair of median setae, directly in front of the posterior pair, which generally is very reduced, is in this species of the same size as the majority of the other setae. The zone of the margin in the space between the posterior setae is straight.

Legs

Robust legs, the third pair seeming to be somewhat shorter.

Coxa I with spine-like posterior seta, which is weaker than the posterior of coxa I, and a curved anterior seta; there is, apart from this, a short and strong spine of sharp apex at the anterior margin. Coxa III with spine-like posterior seta, which is weaker than that of coxa II and somewhat stronger than the anterior of coxa I, and a curved anterior seta. Coxa IV with fine seta, nearer the distal edge and the anterior margin. Genual I with a long seta and genual II with two on the dorsal side. Femura I and II with a longer seta each. Tarsus I with fine hairs, others with spine-like setae longer in tarsus IV.

Description of a ♀ holotipe, No. 1098, caught by the employee of the Instituto Butantan, José Navas, in Butantan, State of S. Paulo, on the 7-5-1937, on a wild rat, known by the common name "rato do taquaral", which lives in "Bamboo-trees" (probably *Oryzomys cliurus* WAGNER or *O. flavescens* THOMAS). We dedicate the specific name to this employee in appreciation of his great help in collecting material.

Gnathosoma

Epistoma membranous, wide, of trilobed apex.

Mandibulae of normal aspect, with crown of setae in the apex of the genual, corresponding to the side of the *digitus mobilis*. Owing to the position of the *mandibulae* it was not possible to verify the existence of the setae, which usually exist at this extremity of the side of the *digitus fixus*. For the same reasons, it was not possible to draw the mandible, which seems to present three teeth in the *digitus fixus* and two in the *digitus mobilis*, such as a not dilated *pilus dentilis*.

Labrum pilous of triangular rounded apex.

Paralabra foliaceous, wide, with thin prolongations.

Malae internae forming pilous *lasciniae*.

Setae maxillicoxales equal in length to the of *hypostomatis internae*, only somewhat wider.

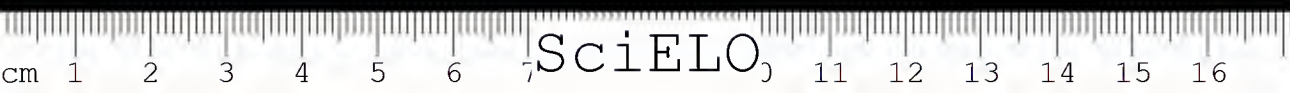
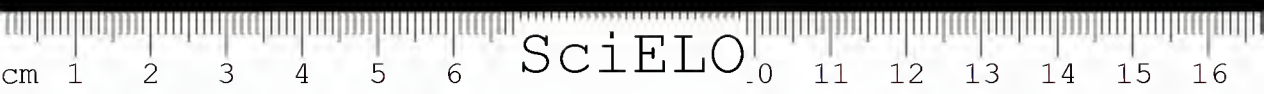
Corniculi weakly chitinized.

Palps normal.

BIBLIOGRAPHY

1. *Fonseca, F. da* — C. R. XIIe Congrès Intern. Zoologie 3:1610-1615.1935 *et* Memorias Inst. Butantan publicado *in separata* em 1935.
2. *Ewing, H. E.* — Proc. Entom. Soc. Washington 27(1):1-7.1925.
3. *Vitzthum, H.* — Treubia 8(1/2):57-79.1926.
4. *Hirst, S.* — Proc. Zool. Soc. London .825.1926.
5. *Ewing, H. E.* — Manual of External Parasites :184-187.1929.
6. *Ewing, H. E.* — Proc. Unit. States Nat. Mus. 82(30):1-9.1933.
7. *Fonseca, F. da* — C. R. XIIe Congrès Intern. Zoologie 3:1597-1602.1935 *et* Mem. Inst. Butantan publ. *in separata* em 1935.
8. *Fonseca, F. da* — Idem, p. 1606-1607 *et* Mem. Inst. Butantan publicado *in separata* em 1935.
9. *Fonseca, F. da* — Mem. Inst. Butantan.
10. *Vitzthum, H.* — Zool. Jahrb. 60(3/4):405-408.1930.
11. *Oudemans, A. C.* — Tijdschr. voor Entomologie 70:179.1927.

(Trabalho da Secção de Parasitologia e Protozoologia do Instituto Butantan. Dado à publicidade em Junho de 1939).

616.968.5:595.42

NOTAS DE ACAREOLOGIA

XXVII. *Liponissus brasiliensis*, sp.n., parasita habitual de roedores e acidental do homem

POR

FLAVIO DA FONSECA

Desde 1930 vimos observando o parasitismo quasi constante de um *Caviidae* brasileiro, *Cavia aperea* ERXL. (*rufescens?*), certamente o mais abundante roedor silvestre da fauna dos Estados do Rio de Janeiro e de São Paulo, por um acariano do genero *Liponissus* KOLENATI, muito proximo de *Liponissus bacoti* (HIRST, 1913). Embora tivessemos verificado algumas diferenças entre o aspeto do acariano, já então encontrado sobre o homem, sobre *Epimys norwegicus*, *Didelphys aurita*, etc., e as figuras de Hirst (1), não nos atrevemos a descrever a especie como nova, mesmo porque, sendo *Liponissus bacoti* (HIRST, 1913) especie já assinalada em quatro continentes, Australia por Hirst, Africa, de onde foi descrito, Europa, por Oudemans (2) e mesmo da America do Norte, seria e continúa a ser de esperar que venha a ser tambem encontrada no Brasil, pois o seu hospedador habitual, *Epimys norwegicus*, a grande ratazana dos esgotos, é cosmopolita e extremamente abundante entre nós.

Concordando a descrição, aliás muito resumida, de *Liponissus bacoti* apresentada por Stanley Hirst, com a da especie por nós encontrada no Brasil, publicámos nas Memorias do Instituto Butantan um trabalho, Notas de Acareologia III (3), no qual referimos o encontro de *Liponissus bacoti* (HIRST) parasitando o homem, *Cavia aperea* e *Epimys norwegicus*, tendo ainda sido feitas por nós mesmo referencias à ocorrencia deste parasita no Brasil, em trabalho sobre parasitas de ratos, publicado em colaboração com Alcides Prado (4), e em outro sobre novas especies de *Liponissus*.

Ainda recentemente na sua obra "Zooparasitas de Interesse Medico e Veterinario", às pp. 80 e 81 (5), Cesar Pinto reproduziu desenhos ineditos que lhe fornecemos de material por nós identificado, colhido sobre *Didelphys aurita*, como sendo de *Liponissus bacoti* (Hirst), quando na realidade se trata da n.sp. que vamos descrever abaixo.

Desde que verificámos a existencia de diferença entre *L. bacoti* e a especie brasileira, puzemo-nos em comunicação com a então especialista em *Acari* do Museu Britanico, onde se acham depositados os tipos de *Liponissus bacoti*, Miss Suzan Finnegan, para que fosse feito o necessario confronto, o que não poude ser realizado na ocasião devido à ausencia da encarregada da Secção, só agora nos tendo sido comunicado pelo dr. Whittick ter sido feita a comparação por Mrs. Hughes, que se está especializando no grupo e que nos enviou o seguinte relatorio:

"*Sternal plate* slightly longer and much wider in *L. brasiliensis*.

Genital and *anal* plates fairly similar.

Peritreme extends to commencement of coxa I in *brasiliensis* and is more undulating. In *bacoti* it only extends to just below the anterior edge of coxa II.

Peritrematal shield in *brasiliensis* is wider and better chitinized and extends full lenght of peritreme. (N. B. this may be due to method of preparation of slide).

In *bacoti*, shield ends anteriorly as an abrupt external lateral projection between coxa II and III and posterior to the aperture.

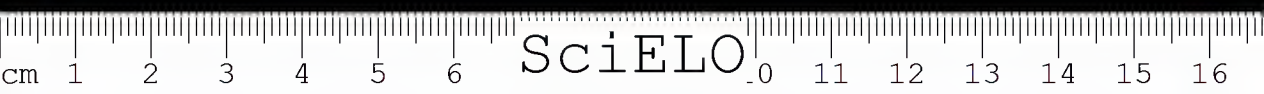
Body hairs more numerous and slightly longer in *brasiliensis*.

Dorsal shield in *brasiliensis* wider anteriorly and does not taper to a point so abruptly as *L. bacoti*".

Descrição da ♀

Especie de tamanho muito variavel com o grao de repleção do exemplar, apresentando os cotipos (♀♀ repletas) 828-900 μ, devendo porém, ser bem menores as dimensões das ♀♀ em jejúm, outros exemplares havendo bem maiores; a côr é pardo-avermelhada nos cotipos devido à coloração do sangue de que estão repletos. A largura dos cotipos ao nivel do 4° par varia de 500 a 550 μ

Face ventral — Placa esternal de superficie reticulada e pontilhada, bem mais larga do que a de *Liponissus bacoti*, comparada com as Figs. de Hirst (1) e de Ewing (2), medindo nos cotipos 76 — 83 μ de comprimento no centro por 133-152 μ de largura no bordo anterior, apresentando, portanto, a relação largura: comprimento = 1,8-2, ao passo que nos desenhos de *L. bacoti* apresenta-

dos por Hirst e Ewing esta relação é respectivamente de 1:2,2 e 1:3. Bordo anterior apenas ligeiramente convexo, bordos laterais ligeiramente concavos e bordo posterior concavo. Cerdas da placa esternal sub-iguais, as anteriores no bordo anterior da placa com 53 μ as posteriores nos angulos posteriores e as medias para dentro dos bordos laterais, mais proximas das posteriores do que das anteriores, ambas com cerca de 68 μ. Placa genital menos aguda do que a de *L. bacoti*, percorrida por linhas longitudinais, com espessamento central longitudinal, apresentando as duas cerdas em frente ao bordo posterior das coxas IV. Placa anal com 168 $\times$ 80 μ, cerdas pares ao nivel da extremidade posterior do anus, lembrando por todos os caracteres a de *L. bacoti*, com anus a 1/2 do seu comprimento da extremidade anterior. Plaqueta para-genital alongada presente, bem como a plaqueta punctiforme situada adiante desta. Duas placas maiores ao lado das coxas IV. Cerdas metaesternais implantadas diretamente na tegumento nú. Plaquetas inguinais pequenas.

Restante superficie ventral com cerdas esparsas que apresentam um pequeno entalhe dorsal.

Estigmas ao nivel do IV par. Peritrema visivel até o nivel do 1° par, com peritrematalia nitida, ao passo que em *L. bacoti* (Hirst) apenas atinge o bordo anterior da coxa II.

Patas — 1° e 4° pares são os mais longos, medindo o 1° cerca de 940 μ e o 4° cerca de 830 μ. Não ha espinhos nas coxas. Tibias I longos. Femures sem espinhos ou cerdas espiniformes.

Gnatosoma — Comprimento total 350 μ até o apice dos palpos. Palpos com 220 μ. Cheliceras longas e finas. Hipostoma com os 3 pares habituais de cerdas, dos quais o postero-interno é o mais longo.

Face dorsal — Escudo dorsal medindo 790 μ estreitando-se gradativamente para trás e não bruscamente estreitado como em *L. bacoti*, de superficie reticulada. Ha 5 pares de cerdas marginais ou sub-marginais na metade anterior até a porção mais alargada do escudo, um par mais interno posterior a estes e tres posteriores, na extremidade posterior; destes o anterior é um pouco mais afastado do mediano do que este do posterior; as cerdas sub-medianas são em numero de 7 pares, dos quais o 4° par é o mais afastado da linha mediana. Entre o par mais anterior e o medio do grupo posterior ha uma marca com minusculo pelo, havendo mais um par de marcas punctiformes iguais, porém sem pelo, ao lado e para frente do par minusculo e dois outros pares de marcas entre a cerda posterior e a media deste grupo.

Descrição baseiada em 4 cotipos ♀♀, capturados sobre *Cavia aperea* No. 275 de Butantan, Estado de São Paulo.

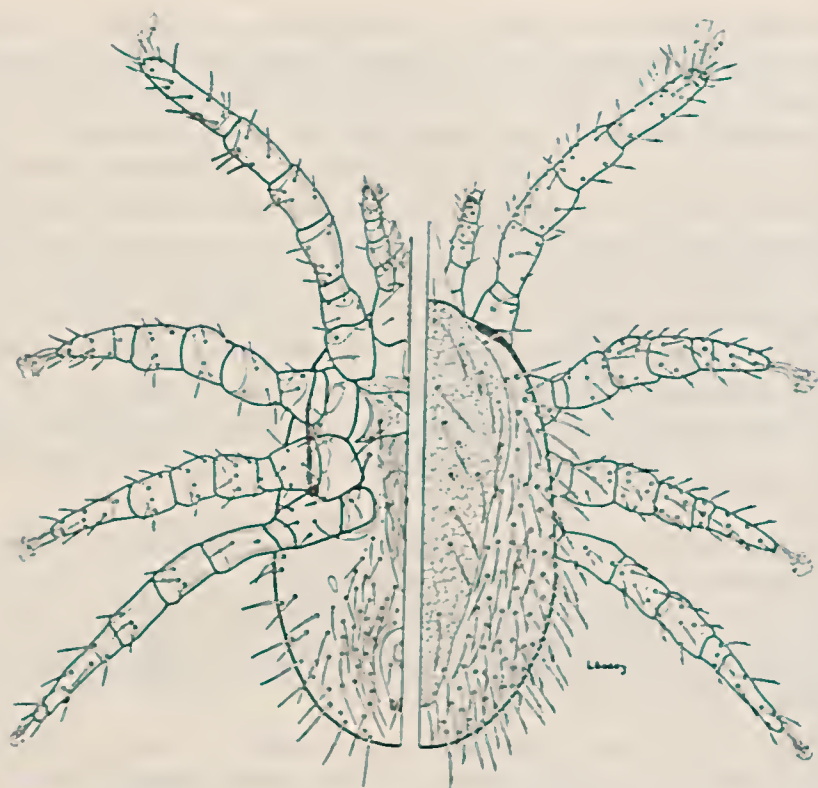



Fig. 1

Descrição do ♂

De dimensões menores do que as femeas e tambem mais raros, medindo o idiosoma 550 μ no alotipo e 592 μ em outro exemplar do lote tipo. A largura ao nivel do IV par é de 300 μ.

Face ventral — Placas fundidas numa só peça alongada, medindo cerca de 440 μ, que vai do bordo anterior da coxa II até a extremidade posterior do corpo. A porção correspondente à placa esternal fica situada entre as coxas II, tem superficie reticulada, é um pouco mais longa do que larga, medindo cerca de 80 μ até a inserção das cerdas posteriores, fazendo saliencia no bordo anterior e a abertura correspondente ao orgão masculino; apresenta dois pares de poros em forma de fenda, os anteriores transversais, situados atrás das cerdas anteriores e os posteriores obliquos e situados entre as cerdas medias e as posteriores, bem afastados dos bordos laterais; os quatro angulos formam prolongamentos entre as coxas I e II e II e III. A esta porção segue-se outra que se estreita gradativamente até o meio das coxas IV, alargando-se em seguida novamente para de novo estreitar-se ao nivel da confluencia com a placa anal. Esta porção apresenta cinco pares de cerdas marginais, ocorrendo, no alotipo, a existencia de uma cerda supranu-

meraria. A porção anal apresenta o anus, com maior diametro de 28 μ no alotipo, duas cerdas pares um pouco para trás do meio do anus, um pouco mais proximas deste do que dos bordos laterais e uma cerda posterior, impar, mais longa do que as pares, ultrapassando de muito o *cribrum*. Todas as cerdas da peça constituida pelas diferentes placas são lisas, mas as externas e as posteriores do tegumento apresentam entalhe apicilar. Plaqueta inguinal presente, bem como uma pequena plaqueta eliptica proxima da placa mediana.

Estigmas ao nivel do IV par. Peritremas visiveis até o meio do 1º par. Placa do peritrema nitida com mancha clara logo atrás dos estigmas.

Face dorsal — Escudo dorsal muito largo, cobrindo quasi todo o corpo, deixando núa apenas estreita faixa lateral do tegumento, de superficie nitidamente reticulada, medindo 555 μ e cerca de 300 μ de maior largura. Apresenta além do par vertical de cerdas curtas, 8 pares de cerdas sub-medianas, dos quais um na extremidade posterior do escudo e cerca de 16 pares marginais ou sub-marginais. Um pouco para diante e para fóra do par posterior ha duas marcas punctiformes; para diante do par de cerdas que se segue a esta ha uma cerda minuscula e para fóra, no bordo do escudo, uma marca punctiforme. Varias outras marcas punctiformes são ainda vistas no escudo dorsal. Todas as cerdas do escudo dorsal são longas, com exceção das verticais, e apresentam entalhe proximo do apice, da mesma forma que as do tegumento nú.

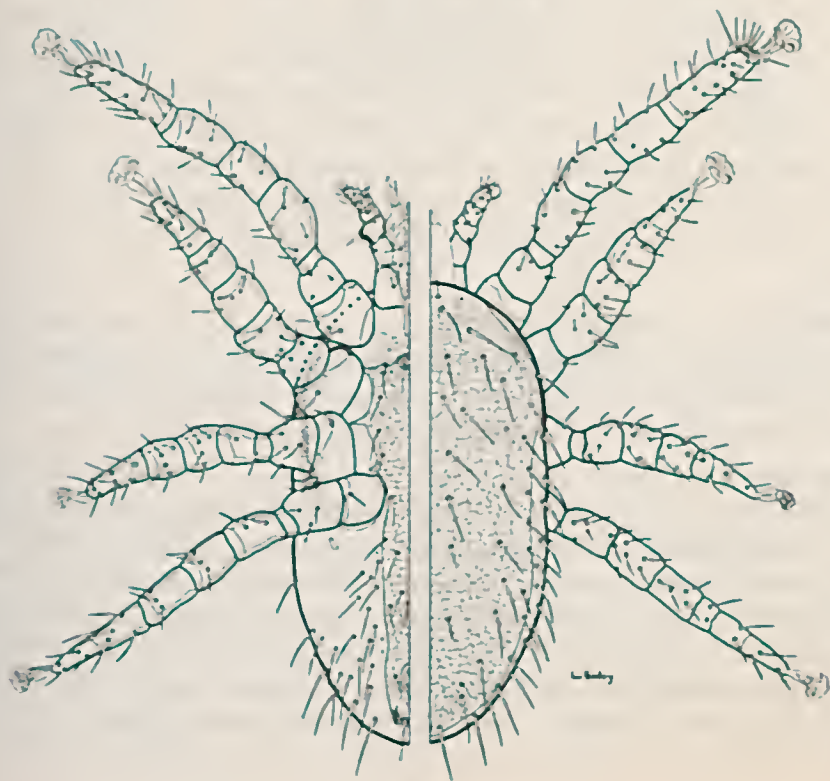



Fig. 2

Gnatosoma

Mede 190 μ até o apice dos palpos. O tritosterno é pouco visivel. A *rima hypopharyngis* apresenta uma serie de denticulos. As cerdas do hipostoma apresentam a mesma disposição das da ♀. Mandibulas com a conformação apresentada pela fig. Palpos apresentando um tuberculo ventral-externo no apice do qual está implantada uma cerda relativamente forte.

Patas — 1º e 4º pares são os mais longos. Coxas sem espinhos exceto a dorsal da coxa II, apresentando 2 cerdas, excetuada a coxa IV que apresenta uma cerda. Tibia I longa; femures sem espinhos ou cerdas espiniformes.

Descrição de um alotipo do mesmo lote que os cotipos ♀ ♀.

Protoninfa

Face ventral — Placa esternal de superficie reticulada, com tres pares de cerdas sub-iguais. Placa anal de bordo anterior achatado e com ligeira elevação central. Cerdas pares um pouco adiante do nivel posterior do anus, a meia distancia entre este e o bordo lateral, cerda impar mais longa do que as pares. Plaquetas inguinais muito pequenas e um par de plaquetas punctiformes ao nivel destas e mais proximas da linha mediana. Entre a placa esternal e anal ha 4 pares de cerdas, dos quais o anterior muito mais curto e os dois posteriores formando uma fileira de 4 cerdas. Dos lados da placa anal um par de cerdas longas e na extremidade posterior um par ainda mais longo. Exceção feita para o par posterior que apresenta um entalhe com filamento, todas as demais cerdas ventrais são lisas.

Estigmas ao nivel do intervalo das 3ª e 4ª coxas. Peritremas encurvados, mal atingindo o bordo anterior da coxa III, com dilatação logo adiante dos estigmas. Escudo do peritrema presente. Adiante da extremidade anterior do peritrema, no bordo lateral, ha uma plaqueta alongada muito nitida.

Face dorsal — Escudo do podosoma com um par de cerdas verticais mais curtas e cinco pares longos até os angulos posteriores. No meio do escudo ha tres pares de cerdas longas, dos quais o 3º par mais afastado da linha mediana. No bordo posterior ha um par de cerdas longas. Dois pares de marcas punctiformes existem neste escudo: um adiante e para fóra do 1º par central e outro adiante e para fóra do par posterior. Escudo pigidial com tres pares de cerdas longas e um par minusculo entre o anterior e o medio, apresentando além disso cerca de sete pares de marcas circulares. As cerdas dos dois escudos apresentam entalhe. Cerca de sete pares de plaquetas são visiveis entre os dois escudos.

Gnatosoma como na femea. Patas como na femea, apenas existindo um espinho dorsal na coxa II.

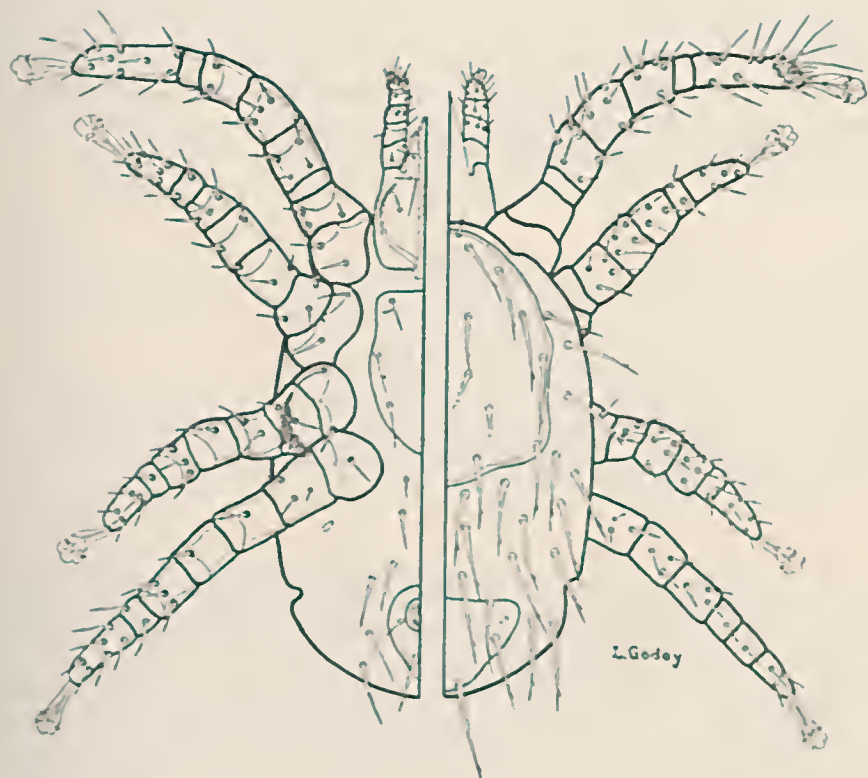



Fig. 3

Larva

Da larva apenas puderam ser observados poucos detalhes pois foi montada logo após o inicio da eclosão, estando ainda com as patas dobradas sobre o idiosoma, o que impossibilitou o exame deste.

Tritosterno presente, bifido, de ramos largos, não pectinado. Cerdas das *maxillicoxae* presentes. Das cerdas do hipostoma apenas existe o par postero-externo. Hipostoma terminando em duas pontas aguçadas e bem quitinizadas. Das mandibulas apenas se vê um esboço, no qual não se distinguem os dedos fixo e movel. Dos palpos não se vêm as linhas divisorias dos articulos. No dorso vêm-se as seguintes cerdas: um par vertical, tres pares sub-marginais de comprimento crescente para trás e quatro pares submedianos, dos quais o segundo constituido por cerdas curtas e o quarto par de cerdas mais longas. Na extremidade posterior ha tres pares de cerdas longas. As cerdas da placa anal são tambem longas.

Descrito de uma larva do lote tipo.

Descrição de 4 ♀♀ cotipos, 1 alotipo ♂, protoninfas e larva, No. 175 da coleção do Instituto Butantan, todos do mesmo lote tipo, capturados pelo autor sobre *Cavia aperea* Erxl., No. 275, em Butantan, São Paulo, Brasil, a 11.VII.1933. Metatypos de *Cavia aperea, Didelphys aurita, Epimys norvegicus, Homo sapiens, Nectomys squamipes, Euryzygomatomys spinosus catellus, Oxymycterus judex, Silvilagus minensis, Gallictis vittata* e ratos silvestres de spp não determinadas, todas de S. Paulo, Brasil.

BIBLIOGRAFIA

1. *Hirst, S.* — Bull. Ent. Res. **5**:215.1914.
2. *Oudemans, A. C.* — Entom. Berichten **8**(182):319.1931.
3. *Fonseca, F. da* — Mem. Inst. Butantan **7**:139.1932.
4. *Prado, A. & Fonseca, F. da* — Rev. Medico-Cirurgica do Brasil **40**(3):65.1932.
5. *Pinto, Cesar* — Zooparasitos de Interesse Medico e Veterinario, Rio de Janeiro, Editor Pimenta de Mello :80 *et* 81.1938.

(Trabalho da Secção de Parasitologia e Protozoologia do Instituto Butantan. Dado à publicidade em junho de 1939).

616.968.5:595.42

ACAROLOGICAL NOTES

XXVII. *Liponissus brasiliensis.* sp. n., usual parasite of rodents and accidental of man

BY

FLAVIO DA FONSECA

Since 1930 we have been stating the almost constant parasitism of a Brazilian *Caviidae*, *Cavia aperea* ERXL. (*rufescens?*), certainly the most abundant wild rodent of the fauna of the States of Rio de Janeiro and São Paulo, by an acarian of the genus *Liponissus* KOLENATI, very similar to *Liponissus bacoti* (HIRST., 1913). Although we observed some differences between the aspect of the acarian, already found on man, on *Epimys norwegicus*, *Didelphys aurita*, etc., and the figures of Hirst (1), we do not dare to describe the species as a new one, because having *Liponissus bacoti* (HIRST) been found in four continents, in Australia by Hirst, in Africa, where it has been described, in Europe by Oudemans (2) and even in North America, it might be found also in Brazil, as its usual host, *Epimys norwegicus*, the large rat of the drains, is very common everywhere and extremely abundant in Brazil.

As Stanley Hirst's description of *Liponissus bacoti*, although very resumed, agrees with that of the species which we found in Brazil, we published a paper in the Memorias do Instituto Butantan, Acarological Notes III (3), in which we mention the finding of *Liponissus bacoti* (HIRST) parasiting man, *Cavia aperea* and *Epimys norwegicus*. We also referred to the occurrence of this parasite in Brazil, in a paper on parasites of rats, published in colaboration with Alcides Prado (4), and in another one on new species of *Liponissus*.

Recently in his book Cesar Pinto (5) reproduced original figures which we furnished him believing to be of *Liponissus bacoti* (HIRST), when it really was the n. sp. which we are now going to describe.

As soon as we found differences between *L. bacoti* and the Brazilian species, we got in contact with Miss Suzan Finnegan, at that time specialist in *Acari* of the British Museum, where the types of *Liponissus bacoti* are preserved, in order to make a comparison. Unfortunately, it could not be done right away due to the absence of Miss Finnegan. Dr. Whittick wrote us now that the comparison has been made by Mrs. Hughes, who is specializing in the group and who sent us the following report:

"*Sternal plate* slightly longer and much wider in *L. brasiliensis*.

Genital and anal plates fairly similar.

Peritreme extends to commencement of coxa I in *brasiliensis* and is more undulating. In *bacoti* it only extends to just below the anterior edge of coxa II.

Peritrematal shield in *brasiliensis* is wider and better chitinized and extends full lenght of peritreme. (N. B. this may be due to method of preparation of slide).

In *bacoti*, shield ends anteriorly as an abrupt external lateral projection between coxa II and III and posterior to the aperture.

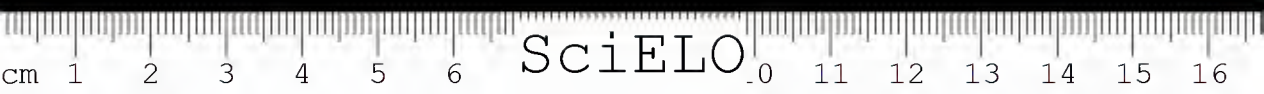
Body hairs more numerous and slightly longer in *brasiliensis*.

Dorsal shield in *brasiliensis* wider anteriorly and does not taper to a point so abruptly as *L. bacoti*".

Description of the ♀

The size of this species varies according to the grade of repletion of the specimen; the cotypes present (replete ♀♀) 828-900 μ, the sizes of the ♀♀ must, however, be much smaller when fasting, other specimens presenting much larger sizes; the colour is brownish-red in the cotypes due to the coloration of the blood with which they are replete. The width of the cotypes at the level of the fourth pair varies between 500 and 550 μ.

Ventral side

Sternal plate — Of reticulated and pointed surface, much wider than that of *Liponissus bacoti*, compared with the figures of Hirst (1) and of Ewing (2), measuring in the cotypes 76-83 μ in length in the centre, by 133-152 μ in width at the anterior margin, showing, therefore, the proportion width: length = 1,8:2, whereas in the figures of *L. bacoti*, presented by Hirst and Ewing, the proportion is 1:2,2 and 1:3 respectively. Anterior margin only slightly convex, lateral margins slightly concave and posterior margin concave. Setae of the sternal plate sub-equal, the anterior ones at the anterior margin of the plate measuring 53 μ, the posterior at the posterior angles and the median inside the lateral margins.

approaching rather the posterior than the anterior, both of more or less 68 μ. Genital plate less pointed than that of *L. bacoti*, crossed by longitudinal lines, thickened longitudinally in the centre, bearing the two setae in front of the posterior margin of the coxae IV. Anal plate 168 by 80 μ, paired setae at the level of the posterior extremity of the anus, recalling by all the characteristics those of *L. bacoti*, with anus at half of its length from the anterior extremity. The elongated para-genital plaquette as well as the punctiform plaquette right in front of the latter are present. Two larger plates at the side of the coxae IV. Metasternal setae implanted directly in the bare tegument. Inguinal plaquettes small.

The rest of the ventral surface bears scattered setae, which present a small dorsal slit.

Stigmata at the level of the fourth pair. Peritreme visible up to the level of the first pair, with distinct *peritrematalia*, whereas in *L. bacoti* (HIRST) it reaches only the anterior margin of coxa II.

Legs — The first and fourth pair are the longest, the first measuring about 840 μ and the fourth about 830 μ. There are no spines in the coxae. Tibiae I long. Femura without spines or spine-like setae.

Gnathosoma

Total length 350 μ up to the apex of the palps. Palps of 220 μ. *Chelicerae* long and slender. *Hypostoma* with the three usual pairs of setae, the postero-internal being the longest.

Dorsal side

Dorsal shield — Measuring 790 μ, narrowing gradually backwards and not abruptly as in *L. bacoti*, with reticulated surface. There are five pairs of marginal or sub-marginal setae in the anterior half of the shield up to the widest portion of the shield, one more internal pair behind those, and three posterior at the posterior extremity; of these the anterior one is somewhat more distant from the median than this from the posterior; the submedian setae are in a number of seven pairs, of which the fourth pair is the most distant from the median line. Between the more anterior pair and the median one of the posterior group there is a mark with a minute hair, another pair of punctiform equal marks, without hair, at the side and frontwards of the minute pair and another two pairs of marks between the posterior seta and the median one of this group.

The description is based on four female cotypes, caught on *Cavia aperea*, No. 275 in the collection of the Instituto Butantan, São Paulo.

Description of the ♂

Of smaller sizes than the female and also rarer, the idiosoma measuring 550 μ in the allotype and 592 in another specimen of the type lot. The width at the level of the fourth pair is 300 μ.

Ventral side — Plates fused into one elongated piece, which goes from the anterior margin of coxa II up to the posterior extremity of the body, measuring about 440 μ. The portion which corresponds to the sternal plate is placed between the coxae II, presents a reticulated surface, is somewhat longer than wide, and measures about 80 μ up to the insertion of the posterior setae, projecting at the anterior margin and the opening which corresponds to the male organ; bears two pairs of slit-shaped pores, the anterior transversal, placed behind the anterior setae and the posterior oblique and placed between the median and the posterior setae, very far from the lateral margins; the four angles form prolongations between the coxae I-II and II-III. Behind this portion there is another one which narrows gradually up to the middle of the coxae IV, widening afterwards again in order to narrow once more at the level of the confluence with the anal plate. This portion bears five pairs of marginal setae, a supernumerary seta being observed in the allotype. The anal portion presents the anus, in the allotype, with a larger diameter of 28 μ, two paired setae somewhat to the back of the middle of the anus, somewhat rather approaching this than the lateral margins and a posterior unpaired seta which is longer than the paired one, surpassing by far the *cribrum*. All the setae of this piece, which is constituted by the different plates, are smooth, but the external and the posterior of the tegument present an apical barb. Inguinal plates as well as a small elliptic plaquette near the median plate.

Stigmata at the level of the fourth pair. Peritremata visible up to the middle of the first pair. Plate of the peritreme distinct, with light spot immediately behind the stigmata.

Dorsal side

Dorsal shield — Very wide, covering almost the entire body, leaving bare only a narrow lateral stripe of the tegument, of distinct reticulated surface, measuring 555 μ and about 300 μ at the widest point. Apart from the vertical pair of short setae, it bears eight pairs of submedian setae, one of which at the posterior extremity of the shield, and about sixteen marginal or submarginal pairs. There are two punctiform marks somewhat in front and outwards of the posterior pair; in front of the pair of setae which follows that, appears a minute seta, and outwards, at the margin of the shield, a punctiform mark. Various other punctiform marks are seen, besides, in the dorsal shield. All the setae of the dorsal shield are long, excepting the vertical ones, and present a slit near the apex, of the same shape as those of the bare tegument.

Legs. — The first and fourth pairs are the longest. Coxae without spines, excepting the dorsal of coxa II. and bearing two setae, excepting the coxa IV, which presents one seta. Tibia I long; femura without spines or spine-like setae.

Description of an allotype of the same lot as the female cotypes.

Gnathosoma

It measures 190 µ up to the apex of the palps. The tritosternum is hardly visible. The *rima hypopharyngis* presents a series of denticles. The setae of the hypostoma show the same distribution as those of the ♀. Palps presenting a ventral external tubercle, at the apex of which a comparatively strong seta is implanted.

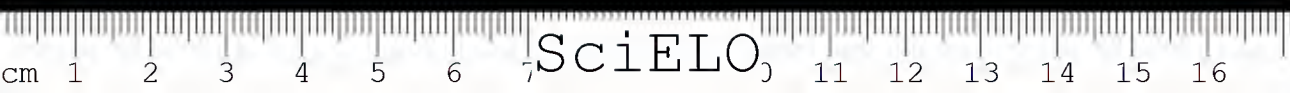
Protonymph

Ventral side

Sternal plate. — Of reticulated surface, with three pairs of sub-equal setae. Anal plate with anterior margin flattened and with slight central elevation. Paired setae somewhat in front of the posterior level of the anus, half way between this and the lateral margin, unpaired seta longer than the paired ones. Inguinal plaquettes very small and a pair of punctiform plaquettes at the level of these and nearer the median line. Between the sternal and the anal plate there are four pairs of setae, the anterior of which is much shorter, and the two posterior forming a line of four setae. At the sides of the anal plate there is a pair of long setae and at the posterior extremity a still longer pair. All the other ventral setae are smooth, excepting the posterior pair which presents a slit with filament.

Stigmata at the level of the space between the third and fourth coxae. Peritremata curved, hardly touching the anterior margin of coxa III, inflated immediately in front of the stigmata. Shield of the peritreme present. There is an elongated, very distinct plaquete at the lateral margin in front of the anterior extremity of the peritreme.

Dorsal side

Shield of the podosoma with a pair of vertical shorter setae and five long pairs up to the posterior angles. There are three pairs of long setae in the middle of the shield, the third pair being more distant from the median line. There is a pair of long setae at the posterior margin. Two pairs of punctiform marks are found on this shield: one in front and outwards the 1.st central pair and the other forwards and outside the posterior pair. Pigidial shield with three pairs of long setae and a minute pair between the anterior and the median ones, presenting, besides, about seven pairs of circular marks. The setae of the two shields show a barb. About seven pairs of plaquettes are seen between the two shields.

Gnathosoma. — The same as in the female. Legs as those of the female, presenting, however, a dorsal spine in the coxa II.

Larve

Of the larve only a few details could be observed, for it has been mounted immediately after the beginning of the eclosion, so that the legs were still folded upon the idiosoma, making an examination impossible.

Tritosternum present, bifid, of wide branches, not pectinated. The setae of the *maxillicoxae* present. Of the setae of the hypostoma only the postero-external pair exists. Hypostoma ends in two sharp and well chitinized points. Of the mandibulae only an utline can be seen, in which the fixed and movable fingers cannot be distinguished. The divisory lines of the joints of the palps are not visible. The back shows the following setae: a vertical pair, three submarginal pairs, the length of which increases backwards, and four submedian pairs, the second one being constituted by short setae, and the fourth pair by longer setae. There are three pairs of long setae at the posterior extremity. The setae of the anal plate are also long.

Type material.

Description of four female cotypes, one male allotype, protonympha and larve, No. 175 in the collection of the Instituto Butantan, all of the same type lot, caught by the author on *Cavia aperea* Erxl., No. 275, in Butantan, São Paulo, Brazil on the 11.7.33. Metatypes of *Cavia aperea, Didelphys aurita, Epimys norvegicus, Homo sapiens, Nectomys squamipes, Euryzygomatomys spinosus catellus, Oxymycterus judex, Silvilagus minensis, Gallictis vittata* and field-rats of undetermined spp., all of São Paulo, Brazil.

BIBLIOGRAPHY

1. *Hirst, S.* — Bull. Ent. Res. 5:215.1914.
2. *Oudemans, A. C.* — Entom. Berichten 8(182):319.1931.
3. *Fonseca, F. da* — Mem. Inst. Butantan 7:139.1932.
4. *Prado, A. & Fonseca, F. da* — Rev. Medico-Cirurg. do Brasil. 40(3):65.1932.
5. *Pinto, Cesar* — Zooparasitos de Interesse Medico e Veterinario, Rio de Janeiro, Editor Pimenta de Mello:80 *et* 81.1938.

616.968.5:595.42

NOTAS DE ACAREOLOGIA

XXVIII. Ocorrencia de *Dermanyssus gallinae* (Degeer, 1778) no Brasil (*Acari. Dermanyssidae*)

POR

FLAVIO DA FONSECA

As referencias até hoje feitas à ocorrencia desta especie no Brasil, provinham da sua confusão com um acariano muito disseminado, parasita habitual de galinaceos, *Liponissus bursa* (Berlese), que o povo conhece com o nome de "piolho de galinha". Isto mesmo frizámos em trabalho anterior, ao descrevermos a unica especie do mesmo genero até agora conhecida do Brasil, *Dermanyssus brasiliensis* Fons., 1937 (1).

Sobre o encontro de *Dermanyssus gallinae* em outros paises da America do Sul não possuimos dados seguros, embora Ewing (2) a tenha por como ocorrente em todos os Estados da União Americana.

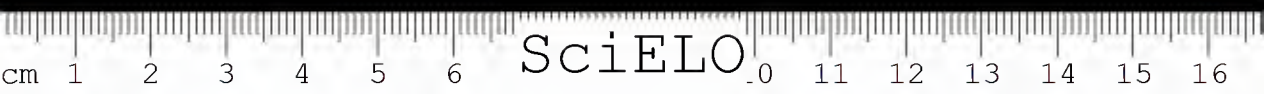
Em 1937, o dr. José Reis, chefe da Secção de Ornitopatologia no Instituto Biologico de Defesa Agricola e Animal, de São Paulo, enviou-nos para determinação uma especie de *Dermanyssus* por êle capturada sobre pintasilgo da Venezuela (*Spinus cuculatus*). Pouco mais tarde efetuou nova captura sobre canarios (*Cerinus canarius*), fornecendo-nos igualmente o material, tratando-se em ambos os casos de passaros de criação nacional.

O exame da especie em questão revelou tratar-se de *Dermanyssus gallinae* (Degeer), parasita habitual de galinaceos na Europa e na America do Norte.

É curioso deixar consignado que esta especie não foi ainda encontrada em galinaceos da mesma região de onde a estamos assinalando, parecendo só agora estar se adaptando, embora certamente já muitas vezes tenha sido importada sem que se tenha aclimatado.

BIBLIOGRAFIA

1. *Fonseca, F. da* — Memorias do Inst. Butantan 10:51.1936.
2. *Ewing, H. E.* — Proc. Ent. Soc. Washington 38(3):47.1936.

616.968.5:595.42

ACAROLOGICAL NOTES

XXVIII. Occurrence of *Dermanyssus gallinae* (DEGEER, 1778) in Brazil. (*Acari. Dermanyssidae*)

BY

FLAVIO DA FONSECA

Reports of this species in Brazil were made on account of ist confusion with a very disseminated acarian, usual parasite of fowls, *Liponissus bursa* (BERLESE), the tropical fowl mite. The same fact has been stressed by us in an earlier paper, when we described the unique Brazilian species of the same genus known up to the present, *Dermanyssus brasiliensis* FONS., 1937 (1).

About the occurrence of *Dermanyssus gallinae* in other countries of South America, we do not possess reliable data, although Ewing (2) considers it a common species, which occurs in all States of the Union.

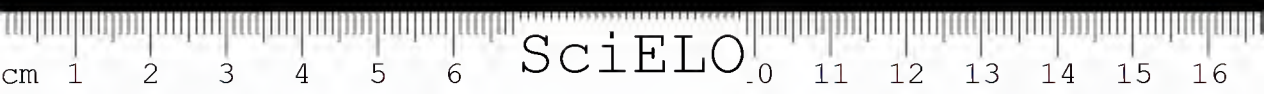
In 1937, dr. José Reis, head of the Section of Ornitopathology of the Instituto Biologico de Defesa Agricola e Animal, in São Paulo, sent us a species of *Dermanyssus*, which he caught on a "pintasilgo" of Venezuela (*Spinus cucu-latus*), for identification. Soon after that, he caught new material on canaries (*Cerinus canarius*), and sent it to us; in both cases the birds were bred in Brazil.

The examination of the species under investigation showed that it was a *Dermanyssus gallinae* (DEGEER), usual parasite of fowls in Europe and North America.

It is a curious fact that this species has not been found yet on fowls in the same region, where we stated this one, and it seems that it is only now adapting itself, although it certainly has been imported several times, without being ac-climated.

BIBLIOGRAPHY

1. *Fonseca, F. da* — Mem. Inst. Butantan 10:51.1936.
2. *Ewing, H. E.* — Proc. Ent. Soc. Washington 38(3):47.1936.

593.17:616.96

PROTOZOARIOS PARASITAS

I. Ciliado gigante, *Muniziella cunhai*, gen. n., sp. n., parasita de *Hydrochoerus capybara* (*Holotricha. Pycnothrichidae*)

POR

FLAVIO DA FONSECA

Os ciliados parasitas de grandes dimensões são extremamente raros; não deixa, por isso, de representar curiosidade digna de nota o encontro, em um representante da familia *Caviidae*, de uma outra especie gigante de ciliado, de que a primeira conhecida é *Pycnothrix monocystoides* SCHUBOTZ, 1907 (1), o maior ciliado parasita até hoje descrito, que atinge até 3.000, parasita dos *Procaviidae* *Procavia capensis* (PALLAS) e *Procavia brucei* GRAY.

Ciliados parasitas de *Hydrochoerus capybara*

O estudo dos ciliados intestinais do *Caviidae Hydrochoerus capybara* foi realizado por Marques da Cunha e Julio Muniz com material proveniente das margens dos rios Paraguai e S. Lourenço, na zona do Pantanal, no Estado de Mato Grosso e de Angra dos Reis, no Estado do Rio de Janeiro.

Por estes autores foram descritas nesse mamifero as seguintes especies de ciliados:

Holotricha:

Protohallidae (CUNHA et MUNIZ, 1925) *syn.*: *Rhipidostomatidae* CUNHA et MUNIZ, 1925 (2, 3):

Protohallia uncinata (CUNHA et MUNIZ, 1925) *syn.*: *Rhipodostoma uncinctum* CUNHA et MUNIZ, 1925 (2, 3).

Paraisotrichidae CUNHA, 1917 (4):

Paraisotricha hydrochoeri CUNHA, 1915 (5)

Paraisotricha acuminata CUNHA, 1915 (5)

Hydrochoerella intestinalis CUNHA et MUNIZ, 1925 (2)

Blepharocorys hydrochoeri Cunha *et* Muniz, 1925 (2)
Enterophryidae Hasselmann, 1918 (6):
Enterophrya elongata Hasselmann, 1918 (2, 6)
Enterophrya piriformis Hasselmann, 1918 (2, 6)

Heterotrichida:

Familia?
Protolutzia hydrochoeri Cunha *et* Muniz, 1925 (2)

Oligotrichida:

Cycloposthiidae Poche, 1913:
Cycloposthium hydrochoeris Cunha, 1915 (5)
Cycloposthium incurvum Cunha, 1915 (5)
Cycloposthium compressum Cunha, 1915 (5)
Cycloposthium magnum Cunha *et* Muniz, 1927 (7)
Cycloposthium cristatum Cunha *et* Muniz, 1927 (7)
Cycloposthium caudatum Cunha *et* Muniz, 1927 (7)
Cycloposthium minutum Cunha *et* Muniz, 1927 (8)
Cycloposthium vorax Cunha *et* Muniz, 1927 (8)

Destas especies as do genero *Enterophrya* Hasselman, 1918, originalmente descritas como parasitas de *Cavia aperea,* foram encontradas tambem em *Hydrochoerus capybara* por Cunha e Muniz, que ainda observaram a presença de *Enterophrya elongata* em *Cavia porcellus.*

A nova especie

Além das de Cunha e Muniz, não nos consta existirem outras pesquisas sobre os ciliados de *Hydrochoerus capybara,* não deixando, todavia, de ser curioso não terem tido estes investigadores ocasião de registar a ocorrencia do ciliado que vai constituir objeto da presente nota, o qual foi encontrado em grande abundancia em quasi todos os exemplares de capivara da mesma procedencia até agora examinados. Por não nos ter sido possivel ultimamente examinar hospedeiros de proveniencias variadas, pouco podemos por ora informar a respeito da distribuição geografica do parasita em estudo, sendo êle até agora apenas conhecido de material dos Estados de São Paulo e de Mato Grosso.

Durante a necropsia de um exemplar de *Hydrochoerus capybara,* proveniente do Parque do Estado, em Agua Funda, cidade de São Paulo, sacrificado na ocasião em nosso laboratorio, o nosso colega, Prof. Paulo Artigas, chamou-nos a atenção para um protozoario gigantesco, facilmente visivel à vista desarmada.

que se encontrava em grande numero no *coecum* desse *Caviidae*. Novos exames procedidos em outros hospedeiros da mesma proveniencia, sacrificados no momento, demonstraram a existencia do mesmo intenso parasitismo.

O exame a fresco revelou tratar-se de um *Ciliata, Euciliata, Holotricha*, rapidamente alteravel após a abertura do *coecum*, sofrendo lise que, em cerca de uma hora, determina o seu quasi desaparecimento do conteudo fecal.

Dimensões. — O que logo chama a atenção neste ciliado são as grandes dimensões, que podem atingir 1620 µ de comprimento e certamente mais; exemplares de 1200 × 820 e de 1.100 × 740 µ de maior largura são frequentes, havendo-os tambem menores, sempre, porém, facilmente visiveis a olho nú. Às suas grandes dimensões deve a especie ter passado até agora despercebida, mesmo às pesquisas de Marques da Cunha e Julio Muniz, em cujo material conservado em massa, proveniente de Porto Joffre, Estado de Mato Grosso, tivemos ocasião de encontrá-lo. Explica-se este fato, aparentemente paradoxal, porque o ciliado se rompe ao peso da laminula durante o exame a fresco, devido à sua grande espessura, tornando-se logo irreconhecivel para quem não esteja prevenido da sua existencia.

Forma. — A forma ovoide predomina, sendo a extremidade anterior mais estreita, ocorrendo, porém, com frequencia a eliptica ou mesmo a sub-circular. Deformações se verificam rapidamente no material visto a fresco, diluido em soluto fisiologico, sem laminula, mesmo tendo-se o cuidado de substituir o liquido com frequencia.

Ciliatura. — O corpo do ciliado é todo densamente revestido de cilios iguais, curtos, com cerca de 10 µ, dispostos em fileiras, com movimento ondulatorio de ritmo rapido (Fig. 6). Estes cilios continuam-se insensivelmente na zona do peristoma, recobrindo-lhe a superficie interna, onde parecem diminuir de tamanho, principalmente na parte posterior da parede interna. No peristoma não ha cilios grandes, nem fusão de cilios constituindo membranas.

Membrana. — O corpo do ciliado é recoberto em toda a periferia por membrana larga, refringente quando vista a fresco após ruptura do ciliado, medindo até 10 µ de largura (Figs. 5 e 6). Esta membrana é constituida por tres folhas: externa, sobre a qual se inserem inumeras fileiras de cilios, originados de granulos basais; interna, muito fina, nitida, intensamente coravel, de aspecto elastico, limitando em toda a extensão o folheto medio; e folha media que exige descrição especial, pois apresenta os mais importantes caractéres da familia. É a mais larga das folhas da membrana do corpo, salvo, talvez, em um ou outro ponto da parede do peristoma em que se estreita a ponto de quasi desaparecer, tal como já tinha sido assinalado por Chatton e Pérard (15 p. 97) em *Nicolella ctenodactyli*. A sua largura, normal nos dois terços posteriores, augmenta bruscamente no anterior, como se vê nas Figs. 2, 3 e 4, a ponto de incluir toda a extremidade anterior, distinguindo-se do endoplasma por seu aspecto mais claro e fibrilar. Tem-se, po-

rém, a impressão de que a zona que ocupa tambem contem protoplasma, pois as mesmas inclusões bacterianas do protoplasma são aí encontradas. Nos cortes que alcançam o peristoma percebe-se ser aí a membrana bem mais fina, principalmente na face interna.

Peristoma — Consta o peristoma de longa e profunda fenda ventral esquerda que tem inicio, na extremidade anterior, em abertura afunilada, prolongando-se para trás às vezes até o terço posterior do corpo (Fig. 1). Esta longa fenda é margeada por dois labios juxtapostos, direito e esquerdo, dos quais o ultimo merece descrição. Nasce da parede dorsal elevando-se para o lado ventral, com a face que olha a fenda do peristoma coberta de cilios pouco mais curtos do que os da restante superficie do corpo. A sua extremidade anterior, que forma a parede esquerda do funil anterior do peristoma é tambem elevada e arredondada. O labio esquerdo se apresenta, portanto, num corte longitudinal e ventral, com o aspecto de uma faixa protoplasmatica rodeada pela membrana e apenas ligada à celula pela extremidade posterior (Figs. 2, 3). Deduz-se do exame de cortes seriados que o labio esquerdo forma a parede externa de uma fenda estreita e profunda, a bolsa do peristoma, de direção antero-posterior e situada à esquerda, a qual lembra de perto a estrutura do peristoma em *Cyathodinium vesiculosum* Marques da Cunha, 1914 (10). Quanto ao labio direito, parece ser formado pela propria parede do corpo tambem revestida de cilios. Em cortes mais profundos apenas se percebe a porção mediana da fenda (Fig. 4), a qual pode ser acompanhada em muitos cortes sucessivos, o que demonstra ser bastante profunda. Nestes cortes se verifica, não só que a ciliatura de suas duas faces parece ser de dimensões mais reduzidas, principalmente a da face interna, como tambem que a cuticula que reveste essas faces é muito mais fina do que a da superficie do corpo.

Não conseguimos observar o ponto exato em que as particulas alimentares penetram o endoplasma celular, isto é, o citostoma propriamente dito. Não foi visto vestigio de canal alimentar, debalde tendo sido procurado, pelo emprego das mais variadas tecnicas, um aparelho nassular ou alguma solução de continuidade da membrana interna da bolsa do peristoma por onde pudessem passar os alimentos, não tendo mesmo sido vistos póros, como os descritos para *Pycnothrix monocystoides*. Só numa serie de cortes, provenientes de um mesmo exemplar, foi vista uma vez uma invaginação da parede direita da bolsa do peristoma, através da qual pareciam ter penetrado os numerosos ciliados que se viam no endoplasma.

Aliás, as grandes dimensões das particular ingeridas, vistas às vezes ainda em bôas condições de conservação no endoplasma, as quais podem ser constitui-

(*) A denominação de peristoma ou bolsa do peristoma é empregada *sensu* Wetzel 1925 (9).

das pelos maiores protozoarios encontrados no *coccum* do hospedeiro ou por detritos vegetais de grandes dimensões, são contrarias à sua penetração por orificio de pequenas dimensões. A hipotese mais provavel é que, penetrado o alimento na fenda ou bolsa do peristoma ganhe êle o interior do protozoario, atravessando a parede interna desta bolsa em um ponto qualquer desprovido de membrana limitante, tal como o acima assinalado. Apesar de termos visto alguns protozoarios no interior da fenda do peristoma do ciliado, não nos foi, todavia, possivel observar o prosseguimento do processo de ingestão, o qual, dada a extrema labilidade e grande opacidade do ciliado em estudo, não poude ser desde logo verificada a fresco.

Citoplasma — Em cortes longitudinais distinguem-se no protoplasma duas zonas, interna e externa, esta mais clara, fibrilar e de alveolos mais finos. O endoplasma muito vacuolizado, apresenta no seu interior grande quantidade de detritos vegetais, às vezes de dimensões consideraveis, bem como microorganismos entre os quais são frequentes os ciliados *Holotricha* e *Oligotricha*, assinalados por Cunha e Muniz no *coecum* de *Hydrochoerus capybara*.

Citopigio — Na extremidade posterior do corpo vê-se, na linha mediana, um citopigio de larga abertura, de margens formadas em curta extensão pelo enbgarnamento da membrana externa do protozoario (Figs. 2, 5 e 6). E' este o unico ponto do corpo em que, com nitidez, foi visto entrar o endoplasma em comunicação com a superficie externa, encontrando-se mesmo, às vezes, nos cortes, detritos já em parte insinuados no citopigio.

Nucleo — A grande espessura da cuticula e do proprio corpo do ciliado tornam impossivel qualquer observação a fresco do citoplasma ou do nucleo. Só provocando, por compressão, a ruptura da celula se vê o nucleo, alongado, porém, muito largo, levemente encurvado, de extremidades ligeiramente mais largas do que a zona central, lembrando o aspeto do nucleo de *Balantidium coli* e de *Pycnothrix monocystoides*. Visto em preparados clareados pelo fenol, unico processo pelo qual foi possivel um exame sem coloração, mostra já a membrana nuclear extremamente larga com cerca de 4 μ, anista. O nucleo tem situação anterior e direita e é de grande eixo antero-posterior ou obliquo, medindo o maior examinado 270 μ. Visto em cortes, tem estrutura granulosa, compacta (Figs. 2, 3) apresentando às vezes vacuolos ou mesmo corpusculos de estrutura igual ou um pouco diversa da da substancia nuclear, os quais poderão em certos casos ser interpretados como o micronucleo, de situação interna, pois não foi possivel divisar estrutura alguma que lembrasse um micronucleo no citoplasma, quer em preparados totais, quer em cortes. Em alguns casos foi possivel verificar aspectos de divisão nuclear, tendo sido visto em um preparado total, um nucleo dividido em tres nucleos filhos (Fig. 1), e em outros constrição mediana, indice de divisão em fase adiantada. Foi este, aliás, o unico sinal de reprodução que poude ser observado no ciliado em estudo.

Sistematica

Os caracteres acima descritos permitem facilmente filiar o ciliado em estudo aos *Euciliata, Holotricha, Stomatea, Trichostomata, sensu* KAHL. Sua colocação entre uma das familias já conhecidas, entretanto, merece algumas considerações mais aprofundadas.

A ciliatura densa e completa, a espessura da membrana e a presença de fibras de sustentação [Karioforos de ten Kate (12)], lembram a familia *Isotrichidae* BÜTSCHLI, principalmente o genero tipo, *Isotricha* STEIN. Difere, porém, desta familia pelo seu tamanho e pelo comportamento de sua membrana. Além disso, o aspecto do peristoma, o qual em *Isotricha prostoma* tem, segundo Shacleton Campbell (13), contorno circular, sendo apenas ligeiramente alongado em *Isotricha intestinalis*, segundo ten Kate (*loc. cit.* Figs 17-32), apresentando o mesmo contorno subcircular em um outro *Isotrichidae*, *Dasytricha ruminantium* (ten Kate, *loc. cit.*), é muito diverso.

Tambem é acentuada a semelhança apresentada pelo peristoma de *Muniziella*, gen. n., com o dos representantes da familia *Cyathodiniidae* MARQUES DA CUNHA, 1914 (10), criada para incluir o genero *Cyathodinium*, que inclúi parasitas do *coecum* de um outro *Caviidae*, *Cavia aperea* ERXL. Muito mais proximo é, porém, o parentesco existente entre *Muniziella*, gen. n., e a aberrante familia *Pycnothrichidae* POCHE, 1913 (4) (= *Nicollellidae* CHATON *et* PÉRARD, 1919) Esta familia foi criada por Poche (*op. cit.*), que para ela erigiu a nova ordem *Pycnotrichidae* POCHE, 1913, para incluir o então unico representante conhecido, *Pycnothrix monocystoides* SCHUBOTZ, 1907 (1), tendo sido o seu estudo aprofundado por Chatton e Pérard em 1919 (11) e 1921 (15). A esta familia pertencem as tres especies seguintes, cujo estudo minucioso, levado a efeito por Chatton e Pérard, nenhuma duvida deixa sobre a sua intima ligação com *Muniziella cunhai*, sp. n.: *Pycnothrix monocystoides* SCHUBOTZ, 1907 (1 e 15), parasita de *Procavia capensis* (PALLAS), da Africa do Sul, e *Procavia brucei* GRAY da Abissinia: *Nicollella ctenodactyli* CHATTON *et* PÉRARD, 1919, parasita de *Ctenodactylus gundi* (PALLAS) de Tunis; *Collinella gundii* CHATTON *et* PÉRARD 1919, tambem parasita de *Ctenodactylus gundi* (PALLAS) de Tunis.

Os ciliados desta familia são, portanto, conhecidos parasitas de duas ordens: *Ungulata* (*Procaviidae*) e *Rodentia* (*Octodontidae, Ctenodactylinae*). A especie aqui descrita provém tambem de um *Rodentia Hystrichomorpha*, mas desta vez da familia *Caviidae*, o maior dos roedores existentes, *Hydrochoerus capybara* ERXL., 1777.

Sobre a distribuição geografica apresenta *Muniziella*, sp. n., a particularidade de ser a unica especie extra-africana da familia.

As dimensões, só ultrapassadas por *Pycnothrix monocystoides*, o extraordinario desenvolvimento do folheto medio da membrana no polo anterior, um de-

mais importantes carateres da familia, e o aspeto excepcional da bolsa do peristoma, constituem os elementos comuns de maior relevo entre *Muniziella cunhai*, sp. n., e os restantes *Pycnothrichidae*.

Não nos é por ora possivel dar um papel decisivo ao fato de não ter sido observado micronucleo na especie em estudo, o que constituiria exceção unica na familia, pois não podemos excluir a hipotese de ter sido o numero de cortes por nós examinados, casualmente insuficiente para surpreender o micronucleo, talvez muito pequeno. Aliás, o preparo de cortes seriados oferece em *Muniziella* dificuldades excepcionais devido à presença no protoplasma de detritos vegetais de grandes dimensões.

Muniziella, gen. n.

Pycnothrichidae constituidos por grandes ciliados de forma eliptica mais ou menos alargada, cuja bolsa do peristoma começa afunilada na extremidade anterior e se prolonga em forma de fenda até para trás do meio do corpo. Seu tamanho, contorno, forma do nucleo, aparelho bucal e citopigio distinguem-no dos tres restantes generos da familia.

RESUMO

Muniziella cunhai, gen. n. *et* sp. n., é um novo ciliado gigantesco, visivel a olho nú, medindo até 1620 μ de comprimento, parasita do *coecum* de *Hydrochoerus capybara* do Brasil. Seu estudo permitiu incluí-lo entre os *Holothricha, Stomatea, Trichostomata, sensu* KAHL, e colocá-lo na familia até agora exclusivamente africana dos *Pycnothrichidae* POCHE.

BIBLIOGRAFIA

1. *Schubotz, H.* — *Pycnothrix monocystoides*, nov. gen., nov. spec., ein neues ciliates Infusor aus dem Darm von *Procavia* (*Hyrax*) *capensis* (PALLAS) — Denkschr. Med. Naturw. Ges., Jena, 13:1.1907.
2. *Cunha, A. Marques da & Muniz, J.* — Contribuição para o conhecimento dos ciliados parasitas dos mamiferos do Brasil — Sciencia Medica 3(12):732-747.1925.
3. *Cunha, A. Marques da & Muniz, J.* — Ciliés parasites des mammifères du Brésil — C. R. Soc. Biologie 97:825.1927.
4. *Cunha, A. Marques da* — Sobre os ciliados do tubo digestivo de mamiferos — 1.ª Conferencia Sul-Americana de Hig., Microb. y Patol. (Buenos Aires):383-390.1917.
5. *Cunha, A. Marques da* — Sobre os ciliados intestinaes dos mammiferos II. — Mem. Inst. Oswaldo Cruz 7(2):139-144.1915.
6. *Hasselmann, G.* — Sobre os ciliados intestinais dos mamiferos — Brasil-Medico 32(11):81.1918.

7. *Cunha, A. Marques da & Muniz, J.* — Trois nouvelles espèces du genre *Cycloposthium* — C. R. Soc. Biol. **96**:494.1927.

8. *Cunha, A. Marques da & Muniz, J.* — Sur quelques ciliés parasites des mammifères du Brésil — C. R. Soc. Biol. **96**:492.1927.

9. *Wetzel, Arno* — Vergleichend cytologische Untersuchungen an Ciliaten — Arch. f. Protistenk. **51**:209-304.1925.

10. *Cunha, A. Marques da* — Über die Darmziliaten der Säugetiere — Mem. Inst. Oswaldo Cruz **6**(3):212-214.1914. Fig. 29.

11. *Chatton, E. & Pérard, C.* — *Nicollella ctenodactyli*, n. g., n. sp., et *Collinella gundi*, n. g., n. sp., ciliés parasites intestinaux du gondi, *Ctenodactylus gundi* PALLAS (rongeur). La famille des *Nicollellidae* nov. fam.. Note préliminaire — Bull. Soc. Zool. (Paris) **44**:10.1919.

12. *Kate, C. G. B. ten* — Über das Fibrillensystem der Ciliaten. 2. Das Fibrillensystem der Isotrichen (*Isotricha* und *Dasytricha*) — Arch. f. Protistenk. **62**:328-354.1928.

13. *Campbell, A. Shackleton* — The structure of *Isotricha prostoma* — Arch. f. Protistenk. **66**:331-339.1929.

14. *Poche, Franz* — Das System der Protozoa — Arch. f. Protistenk. **30**:125-322.1913.

15. *Chatton, E. & Pérard, C.* — Les *Nicollellidae*. Infusoires intestinaux des gondis et des damans et le "cycle évolutif" des ciliés — Bull. Biol. de la France et de la Belgique **50**:87-151.1921.

(Trabalho da Secção de Parasitologia e Protozoologia do Instituto Butantan. Dado à publicidade em Junho de 1939).

Mem. Inst. Butantan
Vol. XII — 1938-39

Fig. 1

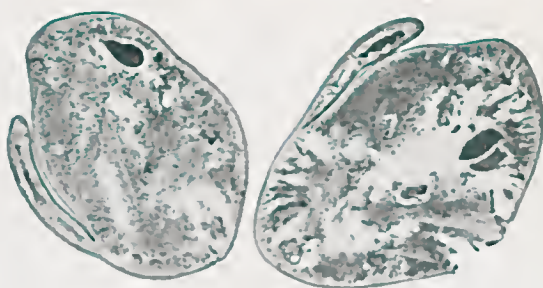



Fig. 2

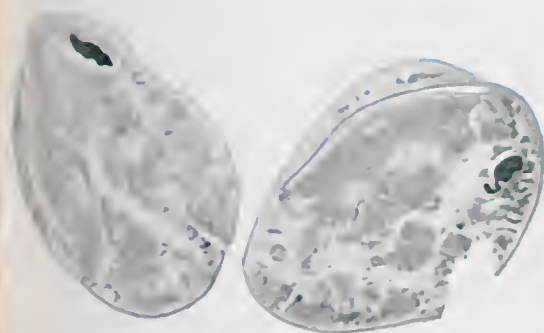
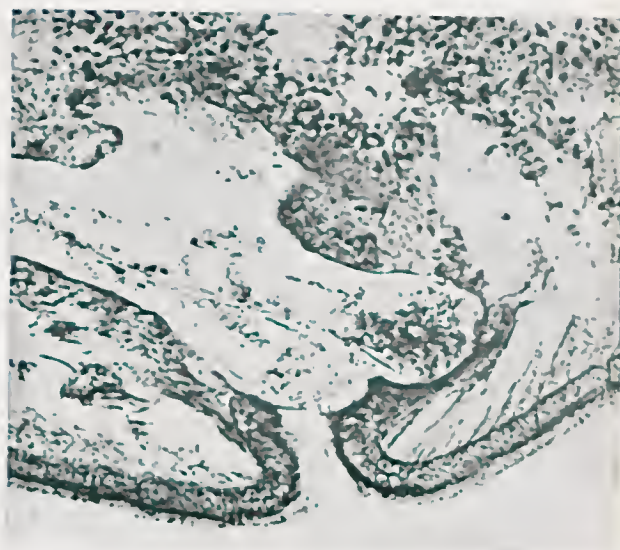
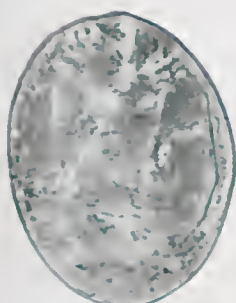
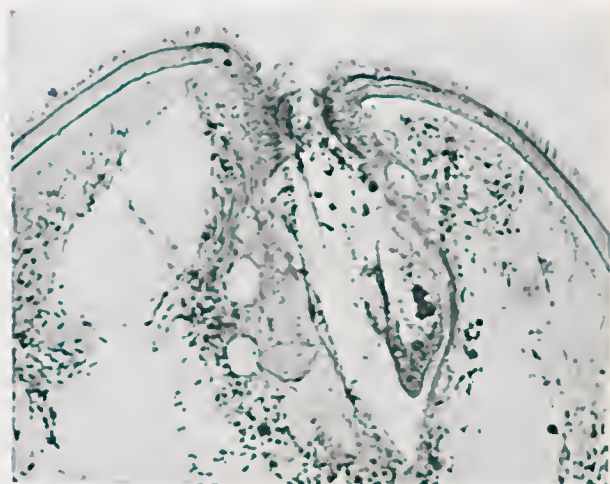



Fig. 3

Fig. 5

Fig. 4

Fig. 6

593.17:616.96

PARASITISCHE PROTOZOEN

I. Ein Riesiges Infusor, *Muniziella cunhai*, gen. n., sp. n., Parasit von *Hydrochoerus capybara* (*Holotricha. Pycnothrichidae*)

von

FLAVIO DA FONSECA

Die bisher als am *Hydrochoerus capybara* parasitierend bekannten Ciliaten.

Ausserordentlich grosse parasitische Ciliaten sind sehr selten. Die grösste der bekannten Arten ist *Pycnothrix monocystoides* SCHUBOTZ, 1907 (1), ein Infusor, das bis 3.000 μ in der Länge erreichen kann und das die *Procaviidae Procavia capensis* und *Procavia brucci* parasitiert. Bemerkenswert its die Tatsache, dass jetzt eine andere riesengrosse Art auf einem Wirt einer verschiedenen Familie, nämlich *Hydrochoerus capybara*, das Wasserschwein, ein *Caviidae*, gefunden worden ist.

Die Darmciliaten von *Hydrochoerus capybara* sind von Marques da Cunha und Julio Muniz bearbeitet worden. Ihr Material stammte aus der Umgebung der Flüsse Paraguay und S. Lourenço, in der Pantanalzone, im Staate Matto Grosso, und aus Angra dos Reis, im Staate Rio de Janeiro.

Von jenen Forschern sind aus diesem Wirte folgende Arten von Ciliaten beschrieben worden:

Holotricha:

Protohallidae (CUNHA *et* MUNIZ, 1925) syn.: *Rhipidostomatidae* CUNHA *et* MUNIZ, 1925 (2 und 3):

Protohallia uncinata (CUNHA *et* MUNIZ, 1925) syn.: *Rhipodostoma uncinatum* CUNHA *et* MUNIZ, 1925 (2 und 3)

Paraisotrichidae CUNHA, 1917 (4):

Paraisotricha hydrochoeri CUNHA, 1915 (5)

Paraisotricha acuminata CUNHA, 1915 (5)

Hydrochoerella intestinalis CUNHA *et* MUNIZ, 1925 (2)

Blepharocorys hydrochoeri CUNHA *et* MUNIZ, 1925 (2)
Enterophryidae HASSELMANN, 1918 (6):
Enterophrya elongata HASSELMANN, 1918 (2 und 6)
Enterophrya piriformis HASSELMANN, 1918 (2 und 6)

Heterotrichida:

Familie?
Protolutzia hydrochoeri CUNHA *et* MUNIZ, 1925 (2)

Oligotrichida:

Cycloposthiidae POCHE, 1913:
Cycloposthium hydrochoeris CUNHA, 1915 (5)
Cycloposthium incurvum CUNHA, 1915 (5)
Cycloposthium compressum CUNHA, 1915 (5)
Cycloposthium magnum CUNHA *et* MUNIZ, 1927 (7)
Cycloposthium cristatum CUNHA *et* MUNIZ, 1927 (7)
Cycloposthium caudatum CUNHA *et* MUNIZ, 1927 (7)
Cycloposthium minutum CUNHA *et* MUNIZ, 1927 (8)
Cycloposthium vorax CUNHA et MUNIZ, 1927 (8)

Von diesen Arten waren die der Gattung *Enterophrya* HASSELMANN, 1918 ursprünglich als Schmarotzer von *Cavia aperea* beschrieben worden. Cunha und Muniz haben *Enterophrya elongata* auch auf *Cavia porcellus* gefunden.

Die neue Art.

Ausser den beiden oben zitierten Autoren ist uns kein anderer bekannt, der sich mit den Ciliaten von *Hydrochoerus capybara* beschäftigt hätte. Immerhin ist es merkwürdig, dass die hier beschriebene neue Art den beiden Protozoologen unbemerkt blieb, da dieser Infusor in reichlicher Anzahl im Dickdarm fast aller Wasserschweine derselben Herkunft zu finden ist, eine Tatsache, deren Ursache weiter unten noch besprochen werden wird.

Da es uns nicht möglich gewesen ist, Material aus anderen Gegenden zu studieren, können wir vorläufig in Bezug auf die geographische Verbreitung dieser Art nur aussagen, dass sie in den beiden Staaten von S. Paulo und Matto Grosso vorkommt. Das typische Material stammt aus S. Paulo.

Diese Art ist zum ersten Mal in unserem Laboratorium bei der Sektion eines Wasserschweins, das aus dem Orchideengarten von Agua Funda in der Stadt S. Paulo stammte, von unserem Kollegen, Prof. Paulo Artigas, der nach

Helminthen suchte, mit blossem Auge gesehen und dem Verfasser sogleich gezeigt worden. Erneute Untersuchungen haben im Dickdarm anderer Wasserchweine derselben Herkunft gleichfalls einen reichlichen Parasitismus erwiesen.

Die Untersuchung an frischem Material hat gezeit, dass es sich um ein *Ciliata, Euciliata, Holotricha,* handelte, das nach Öffnung des Dickdarms schnell einem lytischen Prozess unterging, der innerhalb einer Stunde das fast völlige Verschwinden der Ciliaten bedingt.

Grösse: Die ungeheure Grösse dieser Protozoen ist die erste Tatsache, welche die Aufmerksamkeit bei ihrer Beobachtung erweckt. Sie können bis 1.620 μ in der Länge messen und sicher auch noch mehr; Individuen mit 1.200 zu 820 μ grössten Breite und 1.100 zu 740 μ sind häufig zu sehen; auch kleinere Exemplare sind vorhanden, die jedoch immer noch leicht mit blossem Auge sichtbar sind. Dank ihrer ungeheuren Grösse muss die Art bis jetzt unbekannt geblieben sein. Die Erklärung dieser scheinbar widersprechenden Tatsache liegt darin, dass bei der gewöhnlichen protozoologischen Untersuchungstechnik im frischen Zustande diese Ciliaten durch das Gewicht des Deckglases zerquetscht und dadurch unerkennbar und mit unbelebtem Material verwechselt werden. Zur Beobachtung im lebenden Zustande muss man unbedingt ohne Deckglas arbeiten.

Form: Meistens sind die Parasiten eiförmig, mit einem engeren Vorderende (Fig. 1), elliptische oder sogar fast rundliche Formen sind aber nicht selten. Frisches, in physiologischer Kochsalz-Lösung beobachtetes Material wird leicht deformiert, selbst wenn man die Trocknung durch Hinzufügen von neuem Wasser verhindert.

Bewimperung: Die ganze Oberfläche ist dicht mit untereinander gleichen, kurzen, etwa 10 μ langen (Fig. 6), in Reihen angeordneten Wimpern bedeckt, die eine wellenartige, schnelle Bewegung zeigen. Diese Cileureihen setzen sich in der Peristomgrube weiter fort, wo die einzelnen Elemente kleiner werden, besonders am hintersten Teil der inneren Wand. Im ganzen Peristomfeld gibt es weder grosse isolierte noch verklebte Wimpern die die Membranen bilden.

Körperhülle: Die ganze Oberfäche wird von einer meistens ungerfähr 10 μ breiten (Fig. 5 e 6), im frischen Zustande stark lichtbrechenden Pellikule bedeckt, die aus drei Membranen besteht, welche den seltsamsten Betrag zeigen.

Die äussere Membrane bedeckt normalerweise den ganzen Körper und trägt zahllose Wimperreihen, die auf Basalkörperchen eingepflanzt sind.

Die mittlere Membrane aber, die an den hinteren zwei Dritteln normal ist, breitet sich am vorderen Drittel allmählich auf solche Weise aus, wie man an den Figuren 2, 3 und 4 ersehen kann, dass sie das ganze Vorderende einnimmt. Es ist aber kaum anzunehmen, dass in dieser Gegend auch kein Protoplasma ist, denn man sieht auch hier dieselben zahlreichen bakteriellen Inklusionen, die im Protoplasma vorhanden sind. Vom Endoplasma unterscheidet sie sich durch ihr

klares, fibrilläres Aussehen. Ausnahmsweise verschmälert sich die mittlere Membrane an der Mundgrube soviel, dass nur ein virtueller Raum zwischen der äusseren und der inneren Membrane übrig bleibt, eine Tatsache die auch von Chatton und Pérard (15, S. 97) bei *Nicollella ctenodactyli* beobachtet worden ist.

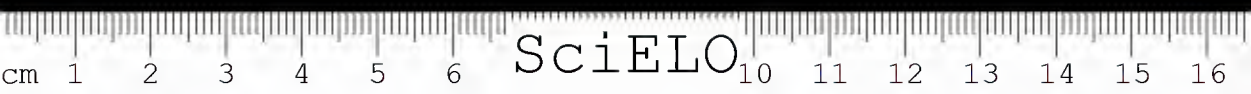
Die innere Membrane ist viel dünner als die äussere, stärker färbar, von elastischem Aussehen und begrenzt überall deutlich die innere Wand der mittleren Membrane; auch bei ihr beobachtet man ein grosses Ausbreiten am Vorderende. Selbst and den fast undurchsichtigen Totalpräparaten kann man sie ab und zu als eine Grenze zwischen dem von der mittleren Membrane gebildeten klaren Vorderende und dem dahinter liegenden, dunkleren protoplasmatischen Teil finden.

Diese Struktur der Körperhülle stimmt völlig überein mit der Arbeit über *Nicollella ctenodactyli* CHATTON et PÉRARD, 1919 (11) und *Pycnothrix monocystoides* SCHUBOTZ, 1909 (1), wie es sich aus dem Vergleich mit der wunderbaren Arbeit von Chatton und Pérard (15) ergibt.

Peristom: (*) Wird von einem langen, tiefen, ventral und links sich befindenden Spalt gebildet, welcher am Vorderende als eine trichterförmige Einstülpung anfängt und sich bis zu dem hinteren Drittel des Körpers fortsetzt (Fig 1). Dieser lange Spalt ist von zwei dicht nebeneinanderliegenden Lippen begrenzt, von denen wir die linke hier kurz besprechen wollen. Sie steigt von der dorsalen Wand der Peristomgrube steil hervor, indem ihr rundliches Vorderende die linke Wand des vorderen Peristomtrichters bildet. Infolgedessen erscheint die linke Lippe in einem ventralen Längsschnitt als ein von der Pellikula umgebener protoplasmatischer schmaller Streifen, der nur am Hinterende mit dem Körper in Verbindung steht. (Fig. 2 und 3). Es ergibt sich aus der Untersuchung von Serienschnitten, dass die linke Lippe die äussere Wand eines tiefen schmallen Spalts, der Peristomgrube, bildet, die links von vorn nach hinten verläuft und dessen Aussehen stark an das von *Cyathodinium vesicolosum* MARQUES da CUNHA, 1914 (10) erinnert. Die rechte Lippe scheint von der mit Wimpern überdeckten Körperwand selbst gebildet zu sein. In tieferen Schnitten sieht man nur die Mittelzone der Grube (Fig. 4), die in vielen aufeinanderfolgenden Schnitten verfolgt werden kann, was ein Beweis ihrer ziemlich grossen Tiefe darstellt. In geschnittenen Ciliaten sieht man nicht nur, dass das Wimperkleid in der Grube kürzer, sondern auch, dass die Pellikula viel dünner ist, als die der Oberfläche.

Es ist nur nicht gelungen, die genaue Stelle festzustellen, wo die Nahrungspartikeln in das Endoplasma eindringen. Obwohl die verschiedensten Techniken angewandt worden sind, wurde kein richtiger Cytoston gesehen. Vergebens

---

(*) Die Bezeichnung von Peristom oder Peristomgrube ist hier *sensu* WETZEL 1925 (9) gebraucht.

ist auch in den meisten Schnitten ein Reusenapparat oder irgend eine Unterbrechung der inneren Membrane der Peristomgrube gesucht worden, wodurch die Nahrung das Endoplasma erreichen könnte. Auch sind keine kleineren Öffnungen zu sehen, wie sie in der Mundrinne von *Pycnothrix monocystoides* beschrieben worden sind. Nur bei einem einzigen Exemplar ist eine weite Einstülpung der Pellikula am Vorderteil der rechten Wand der Peristomgrube gesehen worden, wodurch die zahlreichen am Endoplasma sich befindenden Protozoen Eingang gefunden zu haben schienen.

Die Grösse der von *Muniziella cunhai*, sp. n., verschluckten Nahrungspartikeln, die aus den grössten im Dickdarm des Wirtes sich befindenden Ciliaten oder sogar aus grossen Pflanzenbruchstücken bestehen können, sprechen gegen die Anwesenheit einer engen Eingangsöffnung. Wahrscheinlicher ist es, dass aus der Peristomgrube die Nahrungspartikeln in das Endoplasma durch irgendeine Stelle der inneren Wand eindringen, wo eine Unterbrechung der Membranen stattfindet, wie schon oben gesagt worden ist. Obwohl wir mehrmals Protozoen im Innern der Peristomgrube gesehen haben, ist es uns nicht möglich gewesen, der Undurchsichtigkeit des Ciliaten halber, den ganzen Vorgang der Nahrungsaufnahme im frischen Zustande zu verfolgen.

Protoplasma: Die Beobachtung der in der Länge durchgeführten Schnitte lasst zwei protoplasmatiche Zonen erkennen, von denen die äussere enger, klarer und von fibrillärem Aussehen ist.

Das Endoplasma ist stark vakuolisiert, trägt viele, manchmal sehr grosse Pflanzenbruchstücke, wie auch Mikroorganismen, darunter die von Cunha und Muniz aus dem Dickdarm von *Hydrochoerus capybara* beschriebenen *Oligotricha* und *Holotricha*.

Cytopygium: Am Hinterende liegt in der Mittellinie des Körpers ein breiter Cytopigium dessen Afterröhre von der kurzen Einstülpung der äusseren Pellikula gebildet wird und in einer Ausscheidungsvakuole anfängt. Diese ist die einzige Stelle des Körpers in der eine unmittelbare Verbindung des Endoplasmas mit der Oberfläche ständig gesehen worden ist (Fig. 2, 5 und 6). Es ist manchmal möglich, an der Afterröhre halbhineingedrungene Detrikte zu beobachten.

Makronukleus: Die grosse Dichte der Pellikula macht die Beobachtung des Protoplasmas oder des Kerns im frischen Zustande unmöglich. Wenn man aber durch Druck die Zelle aufplatzen lasst, wird letzterer deutlich als eine grosse, scharf abgegrenzte Masse sichtbar, die schwach gebogen, mit stumpfen Enden und sehr breit ist, manchmal in der Mitte schwach eingeschnürt und stark an dem Makronukleus von *Balantidium coli* und von *Pycnothrix monocystoides* erinnert. Die nach helminthologischer Technik, dem einzigen für eine Beobachtung ohne Farbung möglichen Verfahren, mit Carbolsäure aufgehellten Ciliaten, lassen schon

die ausserordentlich dicke strukturlose Kernmembrane erkennen, die ungefähr 4 μ breit ist. Der Kern liegt nahe dem Vorderende in der Längsrichtung oder auch quer gestellt: der grösste gemessene war 270 μ lang. In Schnitten erscheint die Struktur fein körnig, kompakt (Fig. 2 u. 3); es sind manchmal vakuolen oder sogar Bildungen im Innern des Kerns gesehen worden, die eine entweder gleiche oder nur leicht verschiedene Struktur zeigen, welche vielleicht den Mikronukleus darstellen. Ein äusseres Mikronukleus ist, weder im Totalpräparat noch in zahlreichen untersuchten Schnitten, jemals beobachtet worden.

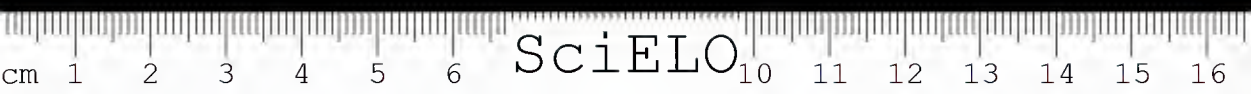
Als Hinweis einer Kernteilung ist manchmal auch die Einschnürrung des Kerns anzusehen. Ein einziges Mal ist ein Kern gesehen worden (Fig. 1), in dem aus der Teilung drei Töchterkerne entstanden sind. Diese waren die einzigen Spuren einer Vermehrung des Ciliaten, die beobachtet werden konnten: cytoplasmatische Teilung ist uns nie zu Auge gekommen.

Systematisches

Die oben beschriebenen Charakteren lassen das hier studierte Infusor leicht in die *Enciliata, Holotricha, Stomatea, Trichostomata, sensu* Kahl, einreihen kann Seine Einschliessung in einer der schon bekannten Familien ist jedoch einer näheren Besprechung wert.

Das dichte, vollkommene Wimperkleid, die grosse Breite der Pellikula und das Vorhandensein von Kernstielen (Karyophoren von ten Kate (12)), erinnern stark an die *Isotrichidae* Bütschli, besonders an die typische Gattung *Isotricha* Stein. Es unterscheid t sich aber deutlich von dieser Familie durch seine Grösse und durch das Benehmen seiner Pellikula. Der Peristom, der im *Isotricha prostoma*, nach Shackleton Campbell (13), rundlich und der der *Isotricha intestinalis*, nach ten Kate (*loc. cit.*, Fig. 17-32), nur schwach verlängert ist, was auch bei einem anderen *Isotrichidae*, *Dasytricha ruminantium* (nach ten Kate, *loc. cit.*) der Fall ist, ist ausserdem bedeutend verschieden.

Grosse Ähnlichkeit zeigt auch *Muniziella*, gen. n., mit den Vertretern der Familie *Cyathodiniidae* Marques da Cunha, 1914 (10), die für die auch im Dickdarm eines anderen *Caviidae*, *Cavia aperea* Erxl., parasitische Gattung *Cyathodinium* begründet worden ist. Da aber diese Ähnlichkeit sich auf das Aussehen des Peristoms beschränkt, darf die neue Art nicht in diese Familie eingereiht werden.

Viel grösser ist die Verwandschaft, die zwischen *Muniziella*, gen. n., und der bemerken werten Familie *Pycnothrichidae* Poche, 1913 (14), (= *Nicollellidae* Chatton *et* Pérard, 1919) besteht. Diese Familie ist von Poche (*op. cit.*) als die einzige einer neuen Ordnung, *Pycnothrichidae* Poche, 1913, für *Pycnothrix monocystoides* Schubotz, 1907 (1) begründet worden, und dann von Chatton und Pérard im Jahre 1919 (11) und 1921 (15) genauer untersucht

worden. Zu dieser Familie werden bis jetzt drei Arten gezählt, deren gründliche von Chatton und Pérard durchgeführte Beschreibung keinen Zweifel über ihre Verwandschaft mit *Muniziella cunhai*, sp. n., bestehen lässt. Die drei bis jetzt bekannten Arten der Familie *Pycnothrichidae* sind folgende:

Pycnothrix monocystoides SCHUBOTZ, 1907 (1 und. 15), Parasit von *Procavia capensis* (PALLAS) aus Südafrika und *Procavia brucei* GRAY aus Abyssinien;

Nicollella ctenodactyli CHATTON *et* PÉRARD, 1919, auch ein Schmarotzer von *Ctenodactylus gundi* (PALLAS) aus Tunis.

Diese Ciliaten sind infolgedessen aus zwei verschiedenen Ordnungen, nämlich *Ungulata* (*Procaviidae*) und *Rodentia* (*Octodontidae*, *Ctenodactylinae*) schon bekannt. Die jetzt hier beschriebene Art stammt auch von einem *Rodentia Hystrichomorpha*, aber diesmal aus der Familie *Caviidae*, dem grössten jetzt lebenden Nagetier, das Wasserschwein, *Hydrochoerus capybara* ERXLEB., 1777.

Über die geographische Verbreitung muss hervorgehoben werden, dass *Muniziella cunhai*, sp. n. ,die einzige ausserafrikanische Art dieser Familie ist.

Die Grösse, die nur von *Pycnothrix monocystoides* überschritten wird, die ausserordentliche Entwicklung der mittleren Wand der Pellikula am Vorderende, die einer der wichtigsten Merkmale der Familie bildet, und die seltsame Verlängerung der Peristomgrube, sind die wichtigsten gemeinsamen Charakteren der *Muniziella cunhai*, sp. n., und der Familie *Pycnothrichidae*.

Dem Fehlen eines Mikronukleus, was eine Ausnahme bei den *Pycnothrichidae* bedeutet, messen wir vorläufig keinen entscheidenden Wert bei, da die Möglichkeit besteht, dass die Zahl der von uns untersuchten Schnitte zufällig nicht ausreichend gewesen ist um den vielleicht zu kleinen Mikronukleus zu sehen und Serienschnitte überhaupt nur sehr schwer bei *Muniziella* wegen den grossen Pflanzenbruchstücken am Protoplasma gelingen.

Muniziella, gen. n.

Pycnothrichidae: Wird von grossen, mehr oder weniger breit elliptischen Ciliaten gebildet, deren Peristomgrube ventral trichterfömig am Vorderende anfängt und spaltförmig bis hinter die Mitte des Körpers verläuft. Sie unterscheidet sich von den anderen drei Gattungen der Familie durch ihre Grösse, Körper - und Kernform, Mundeinrichtung und Cytopygium.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Fig. 1 — Preparado total mostrando o macronucleo em divisão e o peristoma. Coloração pela hematoxilina ferrica (Met. de Heidenhain).

2 — Corte longitudinal no qual se vêm o macronucleo, o citopigio, o labio esquerdo da bolsa do peristoma e o grande espessamento da folha media da membrana, carateristico da familia *Pycnothrichidae*.

3 — Mesmo exemplar da Fig. 2 visto em altura diversa para mostrar as relações do labio esquerdo do peristoma.

4 — Corte passando pelo fundo da bolsa do peristoma.

5 e 6 — Cortes passando pelo citopigio de dois exemplares diferentes, vendo-se a insinuação de detritos, os folhetos da membrana e a ciliatura.

TAFELERKLÄRUNG

Fig. 1 — Totalpräparat. Teilung des Makronukleus. Peristom. Eisenhämatoxilinfärbung nach Heidenhain.

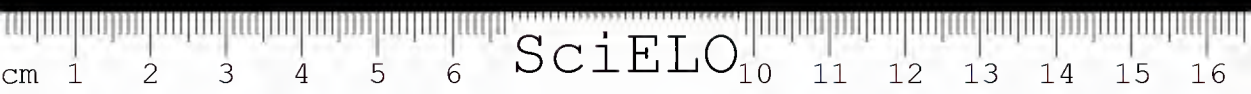
2 — Längsschnitt. Makronukleus, Cytopygium, linke Lippe der Peristomgrube und ausserordentliche Verbreitung der mittleren Membrane der Körperhülle, ein Kennzeichen der Fam. *Pycnothrichidae*, sind sichtbar.

3 — Längsschnitt durch eine andere Höhe desselben Exemplars, um die Beziehungen zu der linken Lippe zu zeigen.

4 — Schnitt durch den Grund der Peristomgrube.

5 u. 6 — Schnitt durch den Cytopygium von zwei verschiedenen Exemplaren. Das Hineindringen von Detrikten, sowohl wie auch die Membranen und die Bewimperung der Körperhülle sind deutlich erkennbar.

(Trabalho da Secção de Parasitologia e Protozoologia do Instituto Butantan. Dado à publicidade em Junho de 1939).

595.77

DESCRIÇÃO DO MACHO DE *FLEBOTOMUS ARTHURI* FONSECA, 1936 (*DIPTERA. PSYCHODIDAE*)

POR

FLAVIO DA FONSECA

(com 3 figuras no texto)

Nem sempre é facil atribuir a uma determinada especie, anteriormente descrita, um exemplar de sexo oposto ao que serviu à descrição, mormente tratando-se de genero com especies numerosas e às vezes distinguidas apenas por filigranas de morfologia. Este é o caso no genero *Flebotomus* RONDANI, 1840, no qual não só as especies são muito numerosas, como tambem de muitas só se conhecem as femeas ou machos. Autores ha que julgam só se ficar autorizado a atribuir um dado exemplar de sexo oposto a uma das especies preexistentes, quando os individuos provém de uma mesma postura ou quando são encontrados em copula, como si fosse materia pacifica que a copula, entre os componentes do genero *Flebotomus*, só tivesse logar entre individuos da mesma especie.

Mesmo abstraidos os casos em que a especie é caracterizada por um elemento morfologico de valor excepcional e presente nos dois sexos, como no subgenero *Pintomyia*, por exemplo, caso que dirime qualquer duvida, ainda assim é às vezes possivel, com alto grau de probabilidade, filiar um novo flebotomo a uma especie já conhecida pela descrição do outro sexo, o que nos parece ser verdade em *Flebotomus arthuri*.

Este especie, por nós já identificada de material capturado em domicilio da periferia da cidade de S. Paulo (rua Oscar Porto), foi originalmente capturada nas matas da Serra da Cantareira, na imediata vizinhança da mesma cidade. Dessas matas, onde, já fazem quatro anos, vimos colecionando *Flebotomus*, só conseguimos até agora obter as especies *F. fischeri* PINTO, 1926, *F. monticolus* C. LIMA, 1932, *F. alphabeticus* FONSECA, 1935, *F. limai* FONSECA, 1935, *F. migonei* FRANÇA, 1920, que aqui assinalamos pela primeira vez, e *F. arthuri* FONSECA, 1936. Das vizinhanças dessa região apenas é conhecida mais uma especie, *F. intermedius* LUTZ et NEIVA, 1912. Ora, de *F. intermedius* e de *F. fischeri* já se co-

nhecem ha muito os ♂ ♂. de *F. monticolus, alphabeticus* e *limai*, apenas foram aí capturados, em quatro anos, um exemplar de cada um dos dois primeiros e dois do ultimo, sendo sem duvida especies raras. Excetuando a especie *intermedius* todas as restantes têm o 5° articulo dos palpos maior do que o 3° salvo, talvez, *F. alphabeticus* de que não se conhece o 5° articulo dos palpos.

O encontro, em um lote de cerca de 200 flebotomos, capturados em domicilio situado naquelas matas, atraídos pela luz, de cerca de 150 ♀ ♀ de *arthuri*, 50 ♂ ♂ e ♀ ♀ de *fischeri* e um só ♂ desconhecido, dá por si só grande probabilidade de tratar-se de ♂ de *arthuri*. Essa probabilidade se transforma em quasi certeza, quando se verifica que, como em *F. arthuri*, o 5° articulo dos palpos no ♂ referido é menor do que o 3° (Fig. 1), o que apenas ocorre em um pequeno numero de flebotomos americanos, entre os quais estão as especies *F. intermedius* e *F. arthuri*. Ha ainda a assinalar que o indice $\frac{\alpha}{\beta}$ está dentro dos limites da relação encontrada nas femeas (Fig. 2).

No ♂ de *Flebotomus arthuri* a formula dos palpos é 1 : 4 : 5 : 3 : 2, igual, portanto, à das femeas. O indice alar, no alotipo, unico exemplar conhecido, é de 2,5 para a relação $\frac{\alpha}{\beta}$, enquadrando-se, portanto, nos limites encontrados para as ♀ ♀, nas quais oscila entre 2 e 3.

DIFERENÇAS ENTRE **FLEBOTOMUS ARTHURI** ♂ E ♂♂ DAS ESPECIES AMERICANAS COM 3.º ARTICULO DOS PALPOS MAIOR DO QUE O 5.º

F. arthuri	F. panamensis	F. rostrans	F. intermedius	F. squamiventris	F. davisi	F. amazonensis	F. lloydi
Espinhos basais da gonapolise superior, na união do ¼ distal com os ¾ proximais do articulo distal. Gonapofise media sem espinhos.	Dois espinhos basais da gonapofise superior separados, ficando o proximal quasi no meio da gonapofise. Gonapofise media com 2 espinhos.	Dois espinhos basais da gonapofise superior separados, ficando um de cada lado do meio do segmento distal. Segmento basal da gonapofise superior alargado. Gonapofise media sem espinhos.	Espinhos basais da gonapofise superior no mesmo nivel, no meio do segmento distal da gonapofise. Gonapofise media sem espinhos.	Espinhos basais da gonapofise superior separados, ficando o proximal na união dos 2/3 distais com o 1/3 proximal do articulo. Gonapofise media sem espinhos.	Com 5 espinhos no articulo distal da gonapofise superior em vez de 4 como todas as outras especies. Gonapofise media dividida em 2 segmentos, dos quais o interno com espinhos.	♂ desconhecido	♂ desconhecido

Pelo exame da Fig. 3 se verifica que o aspecto da terminalia lembra o de *F. intermedius*, da qual a distinguem o comprimento das gonapofises, bem maior em *F. arthuri* e a situação do grupo de espinhos basais, que em *F. arthuri* ficam muito perto dos apicais, ao contrario de *F. intermedius*. De *F. intermedius* distingue-o ainda o fato de ter *F. arthuri* um dos espinhos basais mais fino do que o outro. Com *F. panamensis* a distinção pode desde logo ser feita por estarem nesta especie os dois espinhos basais em nivel diferente, ao passo que se encontram no mesmo nivel em *arthuri*.

BIBLIOGRAFIA

Root, F. M. — Some American species of *Phlebotomus* with short terminal palpal segments — Amer. Journ. Hyg. 20(1):223.1934.

Shannon, R. C. — The occurrence of *Phlebotomus* in Panama — Journ. Washington Acad. Sciences 16(7):19.1926.

Costa Lima, A. da — Sobre os phlebotomos americanos (*Diptera, Psychodidae*). — Mem. Inst. Oswaldo Cruz 26:15.1932.

Costa Lima, A. da — Chave para determinação dos *Flebotomus* americanos — Revista de Entomologia 4(4):427.1934.

Pinto, C. — Tratado de Arthropodos Parasitas, etc. :491.1930.

Pinto, C. — Zoo-parasitas de interesse medico e veterinario:142.1938.

Fonseca, F. da — *Flebotomus* das cercanias da cidade de S. Paulo, com a descrição de *Flebotomus arthuri* n. sp. e *alphabeticus* n. sp. (*Diptera, Psychodidae*) — Revista de Entomologia 6(3/4):323.1936.

Antunes, J. P. — Notas sobre flebotomos sul-americanos. 1. Um novo flebotomo, *Flebotomus lloydi*, encontrado em S. Paulo (*Diptera, Psychodidae*) — Rev. de Biol. e Hygiene 8(1):24.1937.

(Trabalho da Secção de Parasitologia e Protozoologia do Instituto Butantan. Dado à publicidade em Junho de 1939).

Mem. Inst. Butantan
Vol. XII — 1938-39

Fig. 1
Flebotomus arthuri Fons.
Alotipo ♂

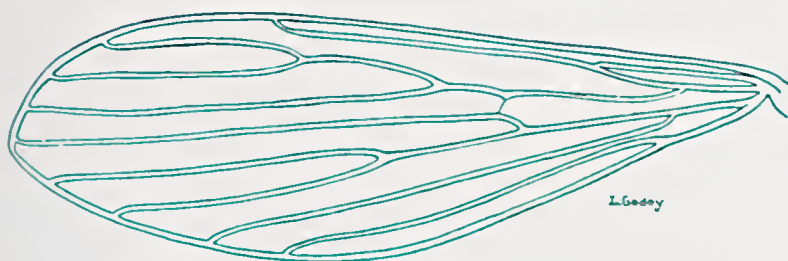
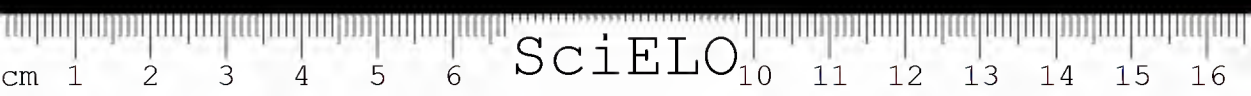



Fig. 2
Flebotomus arthuri Fons.
Alotipo ♂

Fig. 3
Flebotomus arthuri Fons.
Alotipo ♂

616.96

OBSERVAÇÕES SOBRE O CICLO EVOLUTIVO DE *POROCEPHALUS CLAVATUS*, ESPECIALMENTE SOBRE O SEU ORQUIDOTROPISMO EM COBAIAS.

POR

FLAVIO DA FONSECA

O interesse medico apresentado pelo parasitismo do homem por larvas de *Pentastomida* é incontestavel, especialmente no caso do genero *Linguatula* FRÖHLICH, de que existe obeservação já referida do Brasil por Faria e Travassos (1). Mais raros são os casos de parasitismo por larvas do genero *Porocephalus* HUMBOLDT, dos quais, entretanto, ha referencias na bibliografia moderna (2 e 3).

Seria interessante saber até que ponto coincidem as localizações das larvas de *Porocephalus* em parasitismo no homem com as observadas em animais. Nas duas observações de casos humanos, cuja bibliografia foi acima citada, a localização na serosa peritoneal foi a observada, o que coincide em parte com o que se observa em animais de laboratorio. Como, porém, o tropismo testicular é muito acentuado nas infestações experimentais, seria de todo interesse saber si no homem tem logar o mesmo tactismo. No Brasil, onde não raro os ofidios são parasitados por *Porocephalus*, não se deve perder de vista a hipotese de uma possivel contaminação de alimentos com fezes de cobras, unico modo pelo qual a infestação pode ser adquirida pelo homem. O aproveitamento de ofidios para alimentação, como refere Manuwa (2), o que, aliás, não se observa no Brasil, onde é generalizada entre o povo a crença do perigo oferecido pela carne de cobra, não apresenta relação alguma direta com o ciclo evolutivo do parasita. Perigo poderá haver durante o manuseio dos ofidios e consequente contaminação com fezes que apresentem ovos, o que poderá acontecer durante o preparo culinario de um ofidio. O pessoal que por dever de oficio lida com serpentes, nos institutos em que se trabalha em herpetologia, nos museus, jardins zoologicos, etc., ou os "camelots", que não raro os trazem sobre o corpo como elemento de atração do publico, estão, evidentemente mais arriscados a contrair a infestação.

Aproveitando o abundante material de *Porocephalus clavatus* WYMAN, 1845 (Fig. 7⁵) obtido de um exemplar de *Lachesis muta* (LINNEO), No. 1121, capturado em Pedra Corrida, Estado de Minas Gerais, e remetido a este Instituto, instituimos uma serie de experiencias de infestação em animais de laboratorio que nos conduziram a algumas verificações aproveitaveis.

Ratos malhados. — Dois ratos da criação do Instituto, Nos. 1215 e 1216, foram infestados a 20.11.36 com ovos embrionados expulsos com as fezes havia quatro dias, misturados ao alimento (Figs. 8 e 9). Ao cabo de tres meses notava-se grande aumento do volume do abdome, como mostra a fotografia No. 1, tirada 104 dias após a infestação do rato 1215, na qual se pode comparar a diferença notada entre o rato infestado, à direita, e um rato normal.

O rato No. 1215 morreu a 24.3.37, apresentando grande numero de larvas nas serosas de todas as visceras abdominais e toraxicas, bem como ascite e hidrotorax.

O rato No. 1216 morreu a 30.5.37, apresentando aspecto identico das serosas, bem como derrame sanguinolento nas cavidades abdominal e toraxica.

Fato curioso, que não encontrámos registado na literatura compulsada, é o de se observarem larvas em grande abundancia em plena espessura de tecido testicular, determinando grande aumento de volume do orgão. O fato é tanto mais interessante, quanto é este o unico orgão cujo parenquima é parasitado, sendo as larvas encontradas apenas sobre a serosa que reveste os orgãos restantes.

Ratos brancos. — Dois ratos brancos da criação do laboratorio, Nos. 1222 e 1223, foram infestados a 24.11.36 com fezes do mesmo exemplar de *Lachesis muta*, datando de oito dias. Sacrificados, respectivamente, a 17 e a 22.2.37 apresentaram infestação identica aos precedentes, mostrando as Figs. 2 e 7³ um aspecto geral das cavidades toraxica e abdominal do rato 1223, a Fig. 3 o aspecto dos orgãos toraxicos, vendo-se as larvas sobre a pleura e sobre o pericardio; a Fig. 4 mostra o aspecto do testiculo cujo parenquima se acha completamente tomado pelas larvas. A Fig. 7⁴ mostra o aspecto das serosas do No. 1222 invadidas pelas larvas.

Camondongos. — Dois camondongos brancos foram infestados a 20.11.36 com fezes da mesma origem, datando de quatro dias, tendo um deles, o de No. 1217, morrido a 7.12.36, não tendo sido vistas larvas à necroscopia. O de No. 1218, sacrificado a 17.3.37, apresentou larvas nas pleuras parietal e visceral, no mesenterio, nos testiculos, bem como uma sub-cutanea. Duas larvas abcedaram no peritonio.

Dois camondongos brancos, Nos. 1224 e 1225, foram infestados com fezes de *Lachesis* 1121, datando de oito dias. O de No. 1225 morreu a 4.1.37, nada revelando a necropsia. O de No. 1224 apresentava forte infestação ao ser sacrificado a 7.4.37, inclusive testicular, tendo sido encontradas algumas larvas livres

na cavidade peritonial. A Fig. 5 mostra o aspecto do abdome distendido pelo acumulo de larvas nas serosas.

Ratazana (Epimys norvegicus). — Ratazana No. 1241 alimentada a 8.3.37 com fezes provenientes de uma *Bothrops jararaca* (1232) por sua vez infestada a 22.2.37 com larvas provenientes do rato 1223. Sacrificada, foram encontradas algumas larvas nas serosas das visceras abdominais.

Cobaias (Cavia porcellus). — Duas cobaias, Nos. 1220 e 1221, ambas ♂ ♂, foram infestadas a 20.11.36 com ovos expulsos havia quatro dias pela *Lachesis muta* 1121. A de No. 1220 foi sacrificada a 23.2.37, revelando a necropsia infestação pouco intensa e localizada exclusivamente no testiculo. A de No. 1221, sacrificada mais tarde, a 7.4.37, apresentava, ao contrario, infestação intensissima, com larvas completamente desenvolvidas, mas, curiosamente, localizadas tambem exclusivamente no testiculo e epididimo, cujo aumento de volume era notavel, como se podia verificar tanto em vida do animal (Fig. 6), como após a necropsia (Fig. 7[2]). A localização testicular e epididimal parece ser a unica observada em cobaias, sendo, provavelmente, esta a razão pela qual foi Stiles levado a negar a possibilidade de infestação deste cavideo (4).

Duas outras cobaias ♂ ♂, Nos. 1226 e 1227, infestadas a 24.2.37 com fezes eliminadas havia oito dias, não apresentaram parasitismo quando foram sacrificadas a 30.4.37.

Gato 1232 ♂. — Infestado a 8.3.37 com fezes de jararaca 1232 nada apresentou ao ser sacrificada a 19.7.37.

Gato 1242 ♀. — Infestado a 9.3.37 com o mesmo material tambem nada revelou a 19.7.37.

Gato 1248-A ♂. — Infestado com o mesmo material na mesma data igualmente não se mostrou parasitado a 19.7.37.

Coelho domestico 1237. — Infestado a 8.3.37 não apresentou *Porocephalus* a 2.6.37.

Cão jovem ♂ 1238. — Recebeu ovos de *Porocephalus* de jararaca 1232 a 9.3.37; a 30.3 morreu de pneumonia sem apresentar parasitismo.

Cão adulto ♂ 1239. — Inoculado na mesma data com o mesmo material não revelou infestação a 21.7.37.

Didelphys paraguayensis 1240. — Infestado a 19.3.37 com fezes de jararaca 1232 não apresentou parasitas a 19.7.37.

Didelphys paraguayensis 1284. — Infestado a 22.10.37 com ovos de *Porocephalus* de jararaca 1253 — prejudicada, morta a 4.11.37.

Didelphys aurita 1553. — Infestada com ovos de *Porocephalus* de cobra 1235. Prejudicada por ter morrido acidentalmente.

Cerdocyon thous azarae 1532. — Negativo e 1533 (jovens), infestados a 5.11.37 com fezes de cobra 1235 com ovos de *Porocephalus*.

Cerdocyon thous azarae 1554. — Infestado a 5.11.37 com fezes de cobra 1235 com ovos de *Porocephalus* — prejudicado, morto a 26.11.37.

Columbia livia domestica 1249. — Infestada com fezes de jararaca 1232 com ovos de *Porocephalus* a 9.3.37, não apresentou parasitismo a 19.7.37.

Tupinambis teguixin. — Infestado com ovos embrionados de *Porocephalus* não apresentou parasitas quando examinado a 2.2.38.

Verificações em ofidios

ESPECIES		Material infestante	Data inoc.	Data exame	Resultados
Bothrops jararaca					
" "	1231	Rato 1222	17.2.37	6.3.37	negativo
" "	1232	" 1223	22.2.37	8.3.37	5 adultos
" "	1233	" 1223	22.2.37	3.37	2 larvas no peritoneo
" "	1234	" 1223	22.2.37	30.3.37	larvas de 1 cm. no pulmão. Grande infecção pulmonar
" "	1235	" "	"	22.1.38	adultos no pulmão e larvas no peritoneo
" "	1243	Fezes jararaca 1232	8.3.37	30.3.37	negativo
" "	1244	"	"	17.3.37	"
" "	1245	"	"	6.4.37	"
Crotalus terrificus					
" "	1246	"	"	15.4.37	"
" "	1247	"	"	6.5.37	"
Bothrops jararaca					
" "	1264	Rato 1215	24.3.37	24.4.37	"
" "	1265	"	"	25.4.37	"
Bothrops atrox					
" "	1266	"	"	26.4.37	larvas no pulmão e peritoneo
B. jararacussu					
" "	1267	"	"	11.8.37	negativo
Crotalus terrificus					
" "	1268	"	"	3.4.37	2 larvas no torax pouco abaixo do pulmão
" "	1269	"	"	17.5.37	negativo
Bothrops jararaca					
" "	1333	Rato 1216	31.5.37	4.7.37	"
" "	1335	"	"	7.6.37	larvas na pleura e peritoneo
" "	1336	"	"	9.6.37	larva no tecido peritraqueal e no peritoneo
Crotalus terrificus					
" "	1337	"	"	27.6.37	larvas na pleura e peritonio
" "	1338	"	"	"	" "
Bothrops jararaca					
" "	1543	Rato 1515 (*)	12.10.37	26.10.37	negativo
" "	1567	" 1565 (*)	27.10.37	27.1.38	"
" "	1568	" 1565 (*)	27.10.37	21.3.38	um exemplar jovem no pulmão

(*) Ratazanas silvestres, *Nectomys squamipes* BRANTS, com infestação natural por larvas de *Porocephalus* sp., provavelmente *Porocephalus clavatus*.

CONCLUSÕES

Ovos embrionados de *Porocephalus clavatus* expulsos com as fezes havia 4-8 dias, infestaram ratos brancos e malhados, *Epimys norvegicus*, *Mus musculus albinus* e *Cavia porcellus*. Gatos e cães, coelho, *Didelphys paraguayensis*, *Didelphys aurita*, *Marmosa* sp., *Cerdocyon thous azarae* (cão do mato), *Columba livia domestica* e *Tupinambis teguixin*, não apresentaram infestação consequente à ingestão de ovos embrionados.

A localização das larvas limita-se às serosas toraxicas e abdominais, o unico parenquima de orgão afetado sendo o testicular.

Em *Cavia porcellus* não é observada a localização nas serosas, mostrando as larvas tropismo exclusivo para o testiculo e o epididimo.

Larvas de *Porocephalus clavatus*, obtidas por infestação experimental de ratos brancos, prosseguiram o desenvolvimento quando administradas a *Bothrops jararaca*, *Bothrops atrox* e *Crotalus terrificus*.

ABSTRACT

Embryonated eggs of *Porocephalus clavatus* expelled with the feces 4-8 days ago, infested white and speckled rats, *Epimys norvegicus*, *Mus musculus albinus* and *Cavia porcellus*. Cats and dogs, rabbit, *Didelphys paraguayensis*, *Didelphys aurita*, *Marmosa* sp., *Cerdocyon thous azarae*, *Columba livia domestica* and *Tupinambis teguixin*, did no show infestation in consequence of the ingestion of embryonated eggs.

The larves are spread only upon the thoracix and abdominal serouses, the testicular being the unique parenchym involved.

In *Cavia porcellus* the larves were not stated upon the serouses, showing tropism exclusively for the testicle and the epidydimus.

The larves of *Porocephalus clavatus* obtained by experimental infestation of white rats continued developing after ingestion by *B. jararaca*, *B. atrox* and *Crotalus terrificus*.

BIBLIOGRAFIA

1. *Faria, J. G. & Travassos, L.* — Brasil-Medico 27(12):31.1913.
2. *Manuwa, S. L. A.* — West African Med. Journ. 8(3):15.1935.
3. *Elis, M.* — West African Med. Journ. 9(2):41.1937.
4. *Stiles, Ch. W.* — Inaugural Dissertation der Philosophische Fakultät der Universität Leipzig. Leipzig, 1891.

(Trabalho da Secção de Parasitologia e Protozoologia do Instituto Butantan. Dado à publicidade em Junho de 1939).

Fig. 1

Rato normal à esquerda do observador e rato No. 1.215 ♂, este infestado com ovos embrionarios de *Porocephalus clavatus* havia 104 dias. Notar a diferença do volume do abdome devido ao desenvolvimento das larvas no mesenterio e serosas.

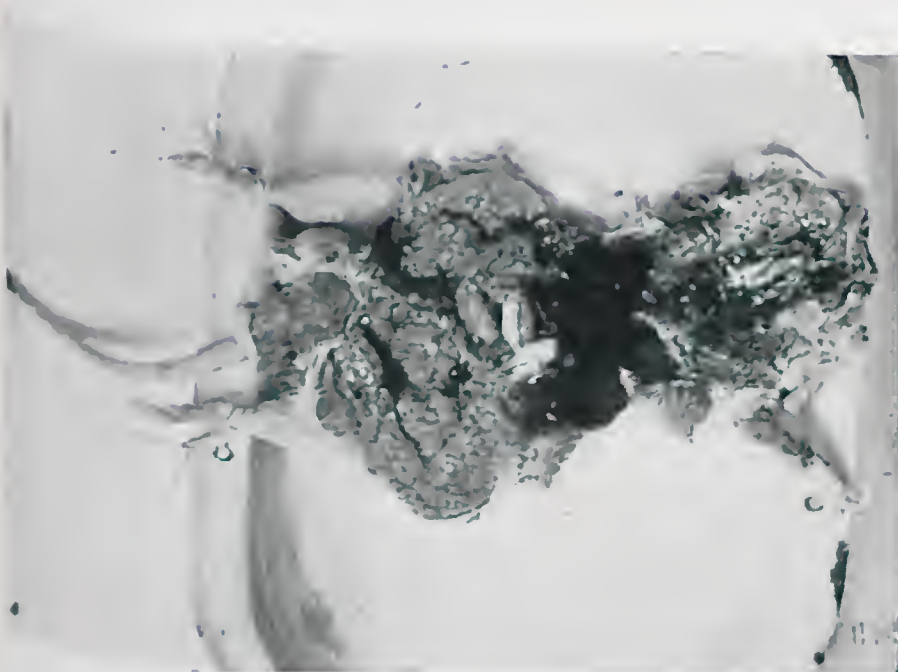



Fig. 2

Porocephalus clavatus — Infestação experimental em rato branco No. 1.223.

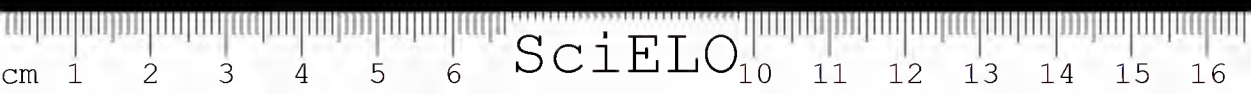
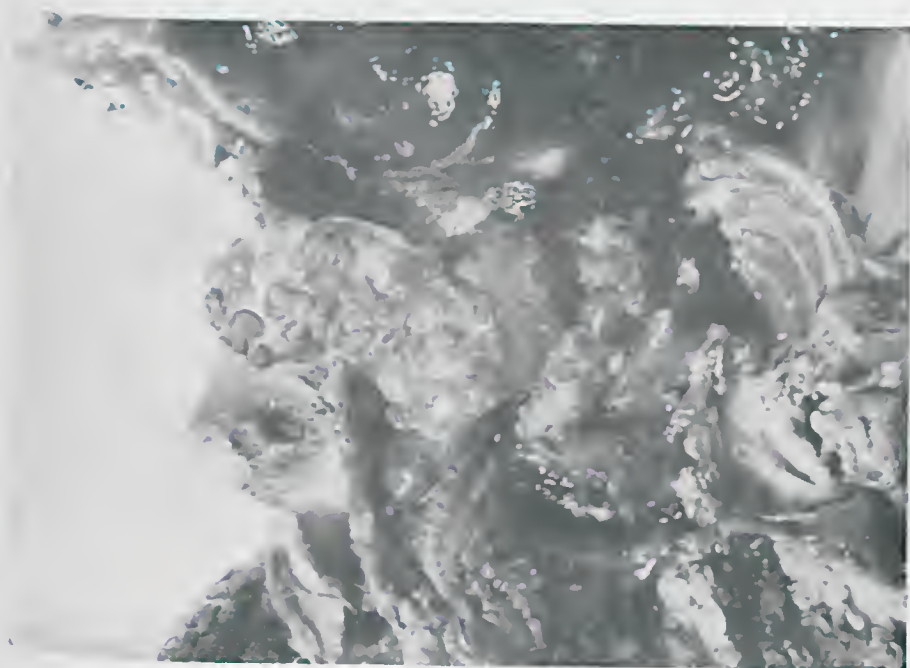



Fig. 3

Porocephalus clavatus de *Lachesis muta.* — Infestação experimental em rato branco No. 1.223. Parasitismo das serosas

Fig. 4

Porocephalus clavatus — Infestação experimental em rato branco No. 1.223 mostrando a invasão do parenquima testicular e consequente hipertrofia do orgão.

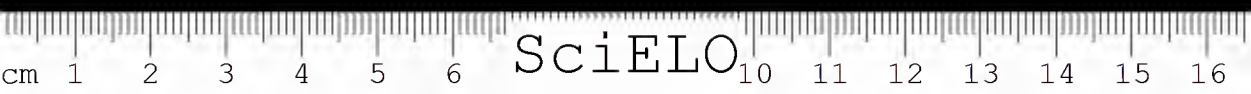



Fig. 5

Camondongo No. 1.224 — 100 dias após infestação com ovos embrionados de *Porocephalus clavatus*. Abdome distendido.

Fig. 6

Cobaia 1.221. — Cobaia com 104 dias de infestação com ovos embrionados de *Porocephalus clavatus*. Notar a extraordinaria distensão dos testiculos pelas larvas enquistadas no parenquima.

Mem. Inst. Butantan
Vol. XII — 1938-39

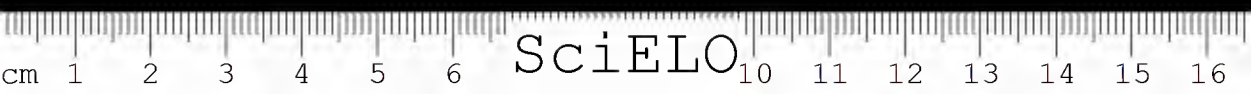



Fig. 7
Infestação experimental de ratos e cobaias com *Porocephalus clavatus*. À direita alguns adultos.

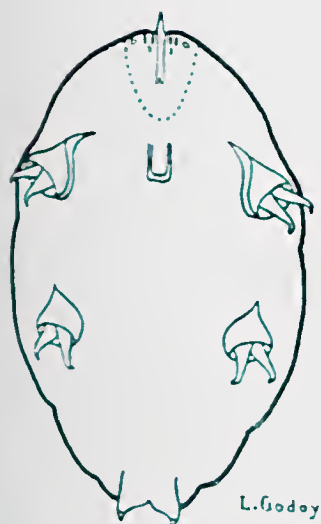



Fig. 8
Embrião de *Porocephalus* retirado do ovo e desenhado durante a vida.

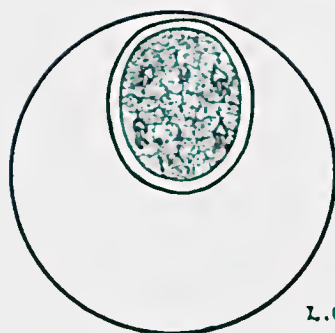
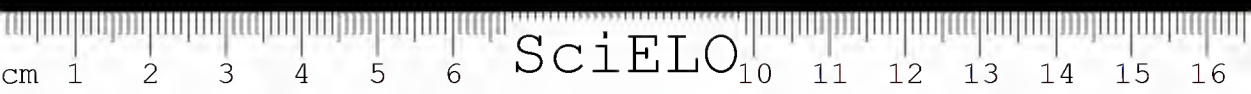



Fig. 9
Ovo embrionado de *Porocephalus* tres dias depois de retirado do intestino de *Lachesis muta*.

595.76

ESPECIES DE *AMBLYOPINUS* PARASITAS DE MURIDEOS E DIDELFIDEOS EM S. PAULO (*COLEOPTERA. STAPHYLINIDAE*).

POR

FLAVIO DA FONSECA

Dos *Coleoptera Staphylinidae* do genero *Amblyopinus* SOLSKY, 1875, parasitas de murideos e didelfideos só foram até hoje descritos do Brasil quatro especies, todas no Sul do país, nos Estados do Rio de Janeiro, Sta. Catarina e Rio Grande do Sul.

Estes curiosos coleopteros levam provavelmente vida apenas parafagistica, mas por isso mesmo que se alimentam de detritos, não é impossivel que sirvam de hospedeiros intermediarios a algum helminto parasita de ratos, gambás ou cuicas, mesmo porque alguns têm, de preferencia, localização perianal, ingerindo certamente detritos fecais e com êles ovos de vermes.

Em consequencia de numerosos exames parasitologicos praticados em ratos silvestres e em didelfideos capturados em São Paulo, foi-nos possivel colecionar varios lotes de *Amblyopinus*, os quais ao serem estudados, revelaram pertencer todos a especies já conhecidas e assinaladas no Brasil, bem estudadas por Costa Lima em dois trabalhos, um em que descreve uma especie nova (1) e outro em que faz a revisão das especies sul-americanas dos generos *Amblyopinus* e *Edrabius* (2).

É interessante deixar consignada a ocorrencia de todas as quatro especies até hoje descritas do Brasil em area relativamente muito restrita, em uma mesma mata do Horto Florestal, na Serra da Cantareira, nas imediações da cidade de São Paulo, Estado onde ainda não havia sido assinalada a presença de representantes do genero, salvo nos trabalhos de Costa Lima, ao qual haviamos enviado material de *A. travassosi* C. LIMA, capturado em Butantan, Estado de São Paulo, e em uma comunicação de Lutz à Sociedade Cientifica de São Paulo, em 1908, segundo refere Costa Lima.

É tambem curiosa a observação que fizemos da ocorrencia de duas especies sobre um mesmo exemplar do camondongo *Thaptomys nigrita* LICHTENST., no qual foram capturados *A. travassosi* C. LIMA e *A. longus* FRANZ.

A revisão das especies sul-americanas feita por Costa Lima torna facil a determinação das especies brasileiras, dada a documentação grafica que apresenta, bem como a chave para especies.

Quanto a esta ultima, deve, porém, ser feito um reparo: *A. longus* FRANZ, 1930, não apresenta fileira cerrada de cerdas curtas no bordo lateral do pronoto, não podendo, portanto, a especie entrar no item 4 da chave proposta. O material que capturámos concorda plenamente com a descrição original de Franz (3), explicando-se o lapso por não dispor Costa Lima dessa especie ao elaborar o seu trabalho.

São as seguintes as referencias da literatura sobre a captura das especies por nós até agora coligidas:

Especie	Hospedeiros	Localidade	Data	Autor
A. gahami FAUVEL, 1901	Rato?	La Plata — Argentina	1901	Fauvel
	Nectomys squamipes	Terezopolis — Brasil	1927	C. Lima
	Oxymycterus rufus	Hansa — Brasil	1930	Franz
A. henseli KOBBE, 1911	*Monodelphys opossum*	Serra de Itatiaia	1923	Notman
	Cuica	?	?	C. Lima
	Didelphys sp.	R. G. Sul ou R. Janeiro	1911	Kobbe
	Metachirus opossum	Serra dos Orgãos	1930	Franz
	Rato silvestre	Angra dos Reis	1936	C. Lima
	Didelphys aurita	Tijuca (Rio de Janeiro)	1936	C. Lima
A. travassosi C. LIMA, 1927	Rato?	Sta. Catarina	1915	C. Lima
	Rato	Est. Rio de Janeiro	1927	C. Lima
	Rato silvestre	Butantan, S. P.	1927	C. Lima
A. longus FRANZ, 1930	*Oxymycterus rufus*	Sta. Catarina	1930	Franz

O material coligido e identificado pelo autor distribuia-se pelos seguintes hospedeiros.

Especie	Hospedeiro	N.º do Exame	Localidade	Data	N.º de exemplares
A. longus	*Thaptomys nigrita* LICHTENST	(1574)	Horto Florestal Serra da Cantareira S. Paulo	4.11.37	2
A. travassosi	*Thaptomys nigrita* LICHTENST	(1574)	Butantan	4.11.37	1
" "	*Oxymycterus judex* THOMAS	(258)	S. Paulo	7.4.37	2
" "	Rato sp.	(314)	"	5.7.37	2
A. gahami	*Nectomys squamipes* BRANTS	(1515)	Horto Florestal	18.9.37	1
" "	" " "	(1540)	Serra da Cantareira S. Paulo	6.10.37	1
" "	" " "	(1551)	"	15.10.37	1
		(1552)	"	"	3
A. henseli	*Didelphys aurita*	(1372)	S. Paulo	28.6.37	3
" "	" "	(1380)	"	5.7.37	1

Ha, portanto, um novo hospedeiro para *A. longus*, o camondongo negro de cauda curta, que caminha sob a folhagem seca dos matos, *Thaptomys nigrita* LICHTENSTEIN, e outro para *A. travassosi*, *Oxymycterus judex* THOMAS, sendo de notar a constancia do hospedeiro para *A. gahami*, *Nectomys squamipes* BRANTS, a grande ratazana das florestas, e a quasi exclusiva especificidade de *A. henseli* para *Didelphyidae*.

A. T. C. S. Morrison-Scott, do Museu Britanico, agradecemos a identificação de dois hospedeiros.

RESUMO

Em uma mesma mata no Estado de São Paulo, foram capturadas as quatro especies do genero *Amblyopinus* SOLSKY até hoje atribuidas ao Brasil, a saber: *A. gahami* FAUVEL, 1901, *A. henseli* KOBBE 1911, *A. travassosi* COSTA LIMA, 1927 e *A. longus* FRANZ, 1930.

Para *A. travassosi* e *A. longus* é descrito um novo hospedeiro.

ZUSAMMENFASSUNG

In einem Wald des Staates São Paulo wurden die vier bis jetzt in Brasilien festgestellten Arten der Gattung *Amblyopinus* SOLSKY gefunden. Es sind folgende: *A. gahami* FAUVEL, 1901, *A. henseli* KOBBE, 1911, *A. travassosi* COSTA LIMA, 1927 und *A. longus* FRANZ, 1930.

Für *A. travassosi* und *A. longus* wird ein neuer Wirt beschrieben.

BIBLIOGRAFIA

1. *Costa Lima, A. da* — Sciencia Medica 5(7):380.1927.
2. *Costa Lima, A. da* — Mem. Inst. Oswaldo Cruz 31(1):55.1936.
3. *Franz, Elli* — Senkenbergiana 12(1):71.1930.

(Trabalho da Secção de Parasitologia e Protozoologia do Instituto Butantan. Dado à publicidade em Junho de 1939).

595.77

OBSERVAÇÃO DE UMA FASE DO CICLO EVOLUTIVO DE *CUTEREBRA APICALIS* GUÉRIN (*DIPTERA. ŒSTRIDAE*)

POR

FLAVIO DA FONSECA

A raridade de publicações sobre o parasitismo de roedores por *Oestridae* sul-americanos, pertencentes aos generos *Cuterebra* e *Rogenhofera*, leva-nos a descrever uma das fases do ciclo evolutivo que nos foi dada acompanhar em *Cuterebra apicalis* GUÉRIN, a mais frequente das especies desses dois generos.

Lutz, na sua monografia de 1917 (1), ao citar a especie de que nos ocupamos, não faz referencia ao prazo exigido pelo parasita para completar as diferentes fases do seu ciclo evolutivo, o qual parece até agora ignorado.

A 24.IV.37 tivemos oportunidade de receber um rato silvestre da especie *Oryzomys eliurus* WAGNER que apresentava duas larvas de um *Oestridae* já em fase final do parasitismo, ambas localizadas subcutaneamente dos lados de um dos membros posteriores (Fig. 1).

Ao cabo de dois dias as larvas abandonaram o hospedeiro, sendo recolhidas a um frasco contendo terra, na qual logo penetraram alguns centimetros em profundidade. A 28.IV.37 já haviam pupado.

Deixadas à temperatura ambiente, humedecida a terra de dias a dias, saiu o primeiro adulto a 19.VIII.37 e o segundo a 13.IX.37.

Durou, portanto, a fase de pupa 113 dias para um dos exemplares e 125 dias para o segundo.

O primeiro adulto obtido foi mantido vivo de 19.VIII a 4.IX, na esperança de que houvesse diversidade sexual e reunidos os dois exemplares tivesse lugar a fecundação, podendo talvez ser observada postura. A morte espontanea do 1º adulto interrompeu, porém, a experiencia.

Observação interessante foi feita a proposito do modo de alçar vôo nesta especie. Para fazê-lo, põe o diptero preliminarmente em vibração com ruido caracteristico e perceptivel de longe, as alulas, extremamente desenvolvidas nesta especie, demonstrando existencia de musculos especialmente encarregados de movi-

mentá-las independentemente da ação sobre as azas. Só depois de vibrarem as alulas por 10 a 20 segundos, alçava o inseto vôo dentro do vidro em que se achava retido.

RESUMO

A fase de pupa de dois exemplares de *Cuterebra apicalis* GUÉRIN, capturados sobre o rato silvestre *Oryzommys cliurus* WAGNER em estado larvario, durou respectivamente 113 e 125 dias.

Antes de alçar vôo, *Cuterebra apicalis* põe em vibração com ruido caracteristico as alulas, que parecem funcionar como um motor de arranque.

ABSTRACT

The pupal stage of two specimens of *Cuterebra apicalis* GUÉRIN, caught as larves while parasiting the wild rat *Oryzomys cliurus* WAGNER, lasted 113 and 125 days respectively.

Immediately before the flight, the alulae of *Cuterebra apicalis*, independently of the wings, vibrate with a very characteristic noise.

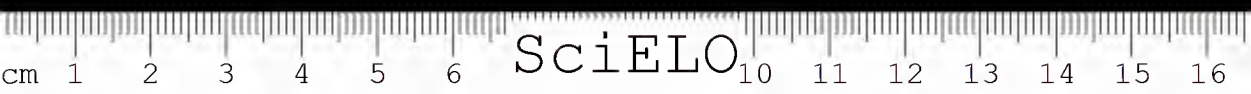
BIBLIOGRAFIA

Lutz, A. — Mem. Inst. Oswaldo Cruz 9(1):94.1917.

(Trabalho da Secção de Parasitolog a e Protozoologia do Instituto Butantan. Dado à publicidade em Junho de 1939).

Fig. 1

Larvas de *Cuterebra apicalis* GUERIN, parasitando o rato silvestre *Oryzomys eliurus* WAGNER.

595.122

BRACHYLAEMUS FLEURYI FONS., 1939 (*FASCIOLOIDEA. BRACHYLAEMIDAE*)

POR

FLAVIO DA FONSECA

Em nota previa publicada anteriormente (1) tivemos oportunidade de descrever como nova especie um *Brachylaemus* encontrado em *coecum* de galinha em São Paulo, Brasil.

O exame das revisões do genero *Brachylaemus* DUJARDIN, 1843, *syn. Harmostomum* BRAUN, 1899, justifica o nosso procedimento, demonstrando a incerteza que reina sobre o valor a atribuir a grande numero de especies desse genero. A disparidade de opiniões sobre a autonomia das formas descritas é tal que alguns especialistas modernos, como Witenberg (2) alinham como bôas numerosas especies, ao passo que outros, como Sinitsin (3), restringem o genero a um minimo de unidades validas, posta a maioria em sinonimia. Outros, ainda, como Dollfus (4), ficam em situação intermediaria, dando tambem valor á diversidade dos hospedeiros e á distribuição geografica como elementos que militam a favor da distinção especifica ou sub-especifica.

Tal diversidade de interpretação do conceito especifico entre especialistas de grande experiencia no grupo, demonstra que ainda perdura grande insuficiencia de conhecimentos sobre os limites de variação morfologica entre as especies de *Brachylaemus*. A menos que se trate de especies que apresentem caracteres diferenciais muito tipicos, continuará, portanto, a haver dificuldade na distinção, o que só um estudo comparado futuro permitirá aplainar, decidindo então sobre o valor que deve ser atribuido a cada uma das variações morfologicas, hoje utilizadas como elemento de distinção especifica.

Caracteres de Brachylaemus fleuryi

Fascioloidea, Brachylaemidae, de forma alongada e extremidades arredondadas, medindo 5440 — 6760 μ de comprimento por 2205 — 2440 μ de maior largura, um pouco deprimido na altura da ventosa acetabular. Ventosa oral sub-

terminal, medindo 735 — 823 μ de comprimento por 882 — 1029 μ de largura. Acetabulo pre-equatorial mais largo do que longo, com 646 — 735 μ de comprimento por 850 — 940 μ de largura. O acetabulo divide o corpo na proporção de 1:2.5 — 1:3.5. A distancia do bordo posterior da ventosa oral ao bordo anterior do acetabulo é de 823 — 1225 μ. À ventosa oral segue-se um faringe muito desenvolvido, com 470 — 588 μ no sentido longitudinal, por 440 μ de largura, o qual, em contração, mediu em um exemplar 323 μ no sentido longitudinal por 970 μ de largura. Não foi possivel verificar a existencia do esofago por estar a região coberta por alças uterinas, tanto no holotipo, quanto nos dois paratipos que estão sendo utilizados na presente descrição. Os cocca, dificeis de examinar por estarem em quasi toda a extensão recobertos pelas alças uterinas, dirigem-se a principio para frente e depois para trás, onde seu campo coincide em frente com o dos vitelinos; o percurso é muito sinuoso, indo terminar na extremidade posterior. O aspecto do intestino e do utero aproxima a especie do subgenero *Postharmostomum* Witenberg, cuja validade tem sido, aliás posta em duvida por varios especialistas, ao passo que outros o elevam à categoria generica.

Testiculos situados quasi inteiramente no quarto posterior do corpo, medindo o anterior 646 — 940 μ de extensão antero-posterior por 735 — 1235 μ de maior largura e o posterior, que é levemente lobado, 529 — 588 μ no sentido longitudinal por 937 — 1176 μ no transversal. A bol a do cirro é pouco pronunciada e de situação pre-testicular.

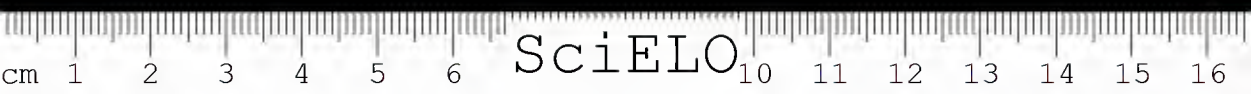
O ovario fica situado do lado direito do testiculo anterior, não ultrapassando a linha media, tendendo para a forma oval e mede 323 — 494 μ no sentido antero-posterior por 411 — 499 μ de maior largura.

Vitelinos submarginais indo desde quasi o meio do acetabulo (no lado direito do holotipo) ou do bordo posterior deste, até o bordo anterior do testiculo posterior. Viteloductus convergindo entre os dois testiculos, com ramo esquerdo mais calibroso. O utero parece apresentar o aspecto atribuido ao subgenero *Postharmorstomum* Witenberg, com alças muito sinuosas que caminham para frente, pela face dorsal, até a altura do faringe, voltando-se em seguida para trás, pela face ventral, até o nivel da bolsa do cirro, terminando em metratermo curto e levemente encurvado. Orificio genital pre-testicular, ao nivel da bolsa de cirro. Ovos muito numerosos, com 31 x 15 μ.

Descrição feita do holotipo e de dois paratipos, colhidos em *coccum* de galinha em São Paulo, Brasil, pelo sr. Carlos Toledo Fleury.

DISCUSSÃO

As especies até hoje assinaladas do Brasil distinguem-se a tal ponto de *Br. fleuryi* que, mesmo adaptado o criterio restritivo de Sintsin, ainda assim não se-

ria possivel identifica-lo a nenhuma das especies assinaladas na região neotropica.

A *Br. opisthotrias* (Lutz, 1895), que, aliás, ocorre tambem em São Paulo, repugnaria identificá-lo já pela diversidade da situação dos hospedeiros na escala zoologica, sendo a especie de Lutz parasita de um marsupial, *Didelphys aurita*. As diferenças morfologicas são, porém, bastante acentuadas para que não seja necessario lançar mão deste caráter. De fato, as dimensões e forma da ventosa oral, do acetabulo, do faringe, dos testiculos e do ovario, bem como o afastamento dos testiculos e o pequeno desenvolvimento lateral das alças uterinas, distinguem-no logo de *Br. fleuryi*. Quanto á altura atingida pelos vitelinos, considerada pela maioria caráter constante, varia em *Br. opisthotrias*, indo desde atrás até o meio do acetabulo, segundo Dollfus, que examinou e figurou material de Lutz.

De *Br. marsupium* (Braun, 1901), parasita de *Odontophorus guajennensis*, syn. *Perdix rufina*, *Br. mordens* (Braun, 1901), encontrado em *Rallus* sp. e *Br. centrodes* (Braun, 1901), que tem como hospedeiros varias aves dos generos *Tinamus* e *Crypturus*, bem como *Nothura maculosa*, todas as tres especies brasileiras, se distancia *Br. fleuryi* pela situação dos vitelinos, que em *Br. fleuryi* apenas alcançam, no maximo, o meio do acetabulo, nivel este ultrapassado nas tres especies citadas. Além disso em *marsupium* o tamanho do ovario iguala o dos testiculos, em *mordens* o utero apenas atinge o acetabulo e a ventosa oral é diversa e em *centrodes* o cirro é armado.

De *Br. mazzantii* (Trav., 1927), parasita de *Columba livia domestica* e de *Columbigallina talpacoti* do Brasil, distinguem-no as dimensões muito menores das ventosas oral e acetabular, a distancia entre estas, as dimensões e forma da faringe, as dimensões e forma dos testiculos e ovario, a posição do ovario, que ultrapassa a linha media em *Br. mazzantii*, a situação do poro genital, que em *mazzantii* fica na area do testiculo anterior, o limite anterior dos vitelinos que em *mazzantii* atinge a zona bifurcal. Além disso em *mazzantii* os coeca são quasi retilineos e o utero tem a disposição descrita para o subgenero *Harmostomum* por Witenberg.

Fica assim eliminada a hipotese de coincidir a especie por nós descrita de *Gallus domesticus* com qualquer outra já assinalada do Brasil, não havendo registo de outras especies neotropicas.

Da America do Norte conhecem-se as especies: *Br. virginianus* (Dickerson, 1930), (*syn.*: *H. migrans* (Dujardin), *H. recurvum* (Dujardin), *H. spinulosum* (Hofma.), *H. equans* Loos, *H. opisthotrias virginianus* Dickerson) especie proxima de *Br. opisthotrias* Lutz, distinguindo-se de *Br. fleuryi* pelas menores dimensões; *Br. peromysci* Reynolds, 1938, cuja ventosa acetabular divide o corpo na proporção de 1:6; *Br. laruei* (McIntosh, 1934), parasita do

roedor *Tamias striatus lysteri*, cujos vitelinos atingem o bordo posterior do faringe; *Br. pellucidus* (WERBY, 1928), parasita de *Planesticus migratorius propinquus*, que logo se diferencia por ter a ventosa oral menor do que o acetabulo.

Mais importante é o estabelecimento do diagnostico diferencial entre *Br. fleuryi* e as especies já assinaladas em *Gallus domesticus* na Europa, Africa e Asia. São elas:

Brachylaemus annamensis (RAILLIET, 1924)
Brachylaemus commutatus (DIES., 1858)
Brachylaemus hawaiiensis (GUBERLET, 1928)
Brachylaemus horizawai (OSAKI, 1925)
Brachylaemus gallinus (WITENBERG, 1923).

Br. annamensis tem dimensões menores para a ventosa acetabular, os vitelinos apenas alcançam o orificio genital, os ovos são menores.

Br. commutatus tem ventosa oral redonda e acetabulo menor; os vitelinos começam ao nivel da area bifurcal. Segundo Joyeux, os testiculos seriam bem menores, da mesma forma que as ventosas. Só em Dollfus se encontra uma citação de Joyeux, *in literis*, assinalando *Br. commutatus* com ventosa oral de 600 µ e mesmo 800 µ, em material de *Meleagris gallopavo*, do Hawaii, e de *Numida meleagris* da Tunisia. Esta é a unica especie considerada valida por Sinitsin entre os parasitas de galinaceos domesticos, colocando-a este autor no genero *Postharmostomum*.

Br. gallinus tem as ventosas oral e acetabular bem menores e o acetabulo circular e dividindo o corpo na proporção de 1:2, ao passo que em *Br. fleuryi* a proporção oscila entre 1:2,5 a 1:3,5 (*); o faringe tem menores dimensões, os vitelinos alcançam atrás apenas o bordo anterior do testiculo anterior o orificio genital fica na area testicular; os ovos são mais largos.

De *Br. horizawai* os ovos grandes, de 35-38 µ × 21-22 µ, já o distinguem.

De *Br. hawaiiensis* distingue-se principalmente pelas dimensões das ventosas oral e acetabular, que são além disso quasi circulares e pela diversidade das dimensões do testiculo e ovario.

Pelo que se deduz da descrição dos autores que admitem a separação das cinco especies já descritas como parasitas de *Gallus domesticus*, nenhuma destas descrições coincide com a da especie por nós encontrada, cujas dimensões são de regra maiores do que as de qualquer outra.

É de notar que Dollfus em sua monografia de 1935, apenas admite categoria sub-especifica para os *Brachylaemus* de *Galliformes* domesticos, reconhe-

(*) A proporção de 1:5 que, por engano do revisor, se lê na descrição original, baseada na holotipo, deve evidentemente, como se deduz da gravura do exemplar que serviu à descrição de *Br. fleuryi*, ser corrigida para 1:2,5.

cendo tres subespecies: *Br. commutatus commutatus, Br. commutatus annamensis* e *Br. commutatus gallinus*, considerados sinonimos da ultima as especies *Br. horizawai* e *Br. hawaiiensis*. *Br. commutatus commutatus* ocorreria apenas na Europa; *Br. commutatus gallinus*, distinto porque os vitelinos não ultrapassam o nivel do bordo posterior do acetabulo, existiria na Africa, Asia e Hawai, e *Br. commutatus annamensis* em Hue, no Annam.

Admitido o criterio de Dollfus, que leva em consideração o hospedeiro e a distribuição geografica, ficaria a especie que descrevemos mais proxima de *gallinus*, não só por ser a de mais dilatada distribuição geografica, como tambem por coincidir mais ou menos o nivel anterior dos vitelinos e por apresentarem ambas carateres comuns ao subgenero *Postharmostomum* WITENBERG. Dadas as diferenças já assinaladas entre as duas especies, não nos é, por ora, licito identificá-las.

Outras especies cujas descrições comparámos, no original ou através de citações, como *B. furcatus* (RUD.), *B. inflatocoelum* (WITENBERG), *B. spinulosus* (HOFM.), *B. helicis* (MECKEL), *B. equans* (LOOS), *B. mesostomus* (RUD.), *B. nicolli* (WIT.), *B. arcuatus* (DUJ), *B. attenuatus* BAER e *B. erinacei* (BLANCH), todas se distinguem de *Br. fleuryi* por caracteres morfologicos, aos quais se vêm juntar os dados zoogeograficos.

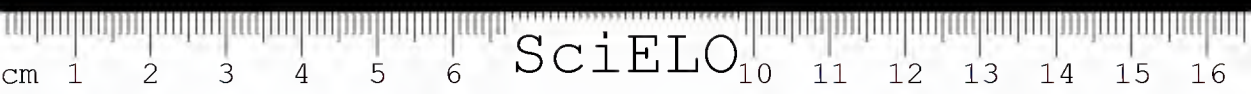
CONCLUSÕES

A especie do genero *Brachylaemus* encontrada em galinha e descrita como *Brachylaemus fleuryi* FONSECA, 1939, não se adapta à descrição de nenhuma das especies do genero até hoje referidas, aproximando-se, todavia, de *Br. gallinus* (WITENBERG, 1925), da qual se distingue pelas dimensões muito maiores das ventosas oral e acetabular, pela forma da ventosa acetabular, que é eliptica, pelas dimensões do faringe, pela situação do orificio genital e pelo tamanho dos ovos.

BIBLIOGRAFIA

1. *Fonseca, F. da* — Boletim Biologico 4 (Nova Série) (1):114.1939.
2. *Witenberg, G.* — Zool. Jahrb., Albt. f. Syst., usw. 51(2/3):167.1925.
3. *Sinitsin, D.* — Ztschr. f. Parasitenk. 3:786.1931.
4. *Dollfus, R. Ph.* — Ann. de Parasit. Hum. et Comp. 12:551.1934 et 13:52.1935.

(Trabalho da Secção de Parasitologia e Protozoologia do Instituto Butantan. Dado à publicidade em Junho de 1939).

595.122

BRACHYLAEMUS FLEURYI FONS., 1939 (*FASCIOLOIDEA. BRACHYLAEMIDAE*)

BY

FLAVIO DA FONSECA

In a preliminary note (1) we had the opportunity to describe as a new species a *Brachylaemus* found in the *coccum* of a hen in São Paulo, Brazil.

A revision of previous works on the genus *Brachylaemus* DUJARDIN, 1843, syn. *Harmostomum* BRAUN, 1899, seems to justify our procedure, showing the uncertainty that prevails about the value to be ascribed to a large number of species of this genus.

The disparity of opinions about the autonomy of most of the forms known is such, that some modern specialists, as Witenberg (2), point out numerous species as good ones, whereas others, such as Sinitsin (3), restrain the forms to a minimum of valid units, and sink the majority as synonyms. Others, as Dollfus (4), hold an intermediary position, considering the diversity of the hosts as well as the geographic distribution as elements that contribute for a specific or sub-specific distinction.

Such a diversity of conception of specific characteristics among specialists with large experience in the group, shows that the researches about the limits of the morphologic variations are still incomplete among species of *Brachylaemus*. Unless they present very typical features, differentiation will continue to be difficult and only a future comparative study will permit to remove these difficulties and to decide about the value to be ascribed to each of the morphologic variations used nowadays as elements for the specific distinction.

Characters of **Brachylaemus fleuryi**

Fascioloidea, Brachylaemidae, of elongated shape with rounded extremities, measuring 5440 - 6760 μ in length by 2205 - 2440 μ at the widest point, somewhat depressed at the height of the acetabulum. Oral sucker subterminal, measuring 735 - 823 μ in length by 882 - 1029 μ in width. Acetabulum

pre-equatorial, wider than long, 646 - 735 μ in length by 850 - 940 μ in width. The acetabulum divides the body in the ratio 1:2.5 - 1:3.5 (*). The distance from the posterior margin of the oral sucker to the anterior margin is 823 - 1225 μ. The oral sucker is followed by a very strong pharynx, measuring 470 - 588 μ in length by 440 μ in width, which, in contraction, has measured in a specimen 323 μ in length by 970 μ in width. It was not possible to verify the existence of an oesophagus because this region is covered by uterine loops, in the holotype, as well as in the paratypes which are used in the present description. The *cocca,* difficult to examine because they are covered almost over the whole extension by the uterine coils, proceed first anteriad and then posteriad, their fields matching in front that of the vitellaria; the course is very sinuous, ending at the posterior extremity. The aspect of the intestine and of the uterus approaches the species to the sub-genus *Postharmostomum* WITENBERG, the validity of which, besides, has been doubted by various specialists.

Testicles situated almost entirely in the posterior quarter of the body, the anterior with 646 - 940 μ of antero-posterior length by 735 - 1235 μ at the widest point, and the posterior, which is slightly lobated, 529 - 588 μ in length by 937 - 1176 μ in width. The cirrus pouch is less pronounced and of pre-testicular situation.

The ovary is placed at the right side of the anterior testicle not surpassing the median line, of almost oval shape, and measures 323 - 494 μ antero-posteriorly by 411 - 499 μ at the widest point.

Submarginal vitellaria starting from almost the middle of the acetabulum (at the right side of the holotype) or from its posterior margin, up to the anterior margin of the posterior testicle. Vitelloducti converging between the two testicles, with a left more calibrous branch. The uterus seems to present the aspect attributed to the sub-genus *Postharmostomum* WITENBERG, with very sinuous loops that proceed anteriad, at the dorsal side, up to the heigth of the pharynx, then turning back, at the ventral side up to the level of the cirrus pouch, ending in a short, slightly curved metraterm. Genital orifice pre-testicular, at the level of the cirrus pouch. Eggs very numerous sized 31 × 15 μ.

Description from the holotype and two paratypes, caught in the *coecum* of a hen in São Paulo, Brazil, by Mr. Carlos Toledo Fleury.

DISCUSSION

The species described up to the present in Brazil are so different from *Br. fleuryi* that, even admitting the restrictive criterion of Sinitsin, it would not be possible to identify it with any one of the species reported from the neotropic region.

(*) The proportion 1:5 referred in the original description evidently is an erratum, and should be changed to 1:2.5, which is the correct one.

It would be difficult to believe, *a priori*, in an identity with *Br. opisthotrias* (LUTZ, 1895), which, besides, occurs also in São Paulo, on account of the diversity of the zoological situation of the hosts, the species of Lutz being a parasite of a marsupial, *Didelphys aurita*. Morphological differences are, however, marked enough to avoid the necessity to apply such a criterion. Really, the dimensions and shape of the oral sucker, acetabulum, pharynx, testicles and the small lateral development of the uterine loops, distinguish it immediately from *Br. fleuryi*. The level reached by the vitellaria, considered by the majority as a constant character, varies in *Br. opisthotrias*, going from the posterior margin up to the middle of the acetabulum, according to Dollfus, who examined and figured material of Lutz.

From three other Brazilian species, *Br. marsupium* (BRAUN, 1901), parasite of *Odontophorus guajennensis*, syn. *Perdix rufina*, *Br. mordens* (BRAUN, 1901), caught on *Rallus* sp., and *Br. centrodes* (BRAUN, 1901), which has as hosts several birds of the genera *Tinamus* and *Crypturus*, as well as *Nothura maculosa*, *Br. fleuryi* is distinguished by the anterior situation of the vitellaria, which in *Br. fleuryi* reach, at the maximum, but the middle of the acetabulum, this level being surpassed in the three species mentioned. Besides, the size of the ovary in *marsupium* resembles that of the testicles; in *mordens* the uterus reaches only the acetabulum, the oral sucker being different; and in *centrodes* the cirrus is spinous.

It is distinguished from *Br. mazzantii* (TRAV., 1927), parasite of *Columba livia domestica* and of *Columbigallina talpacoti* from Brazil, by the much smaller size of the oral sucker and acetabulum, the distance between these, the size and shape of the pharynx, testicles and ovary, the position of the ovary, which surpasses the median line in *Br. mazzantii*, the situation of the genital pore, which in *mazzantii* lies in the field of the anterior testicle, the anterior limit of the vitellaria which in *mazzantii* reaches the bifurcal zone. Besides, the *coeca* in *mazzantii* are almost straight and the uterus has the situation which was described for the sub-genus *Harmostomum* by Witenberg.

This way, the hypothesis that the species of *Gallus domesticus* described by us may be identical to any other one occurrent in Brazil is removed, there existing no record of other neotropic species.

Of North American species are known the following: *Br. virginianus* (DICKERSON, 1930), [syn. *H. migrans* (DUJARDIN), *H. recurvum* (DUJARDIN), *H. spinulosum* (HOFMA.), *H. equans* LOOS, *H. opisthotrias virginianus* DICKERSON], species which recalls *Br. opisthotrias* LUTZ, being distinguished from *Br. fleuryi* by the smaller size; *Br. peromysci* REYNOLDS, 1938, the acetabulum of which divides the body in the ratio 1:6; *Br. laruei* (MCINTOSH, 1934), parasite of the rodent *Tamias striatus lysteri*, the vitellaria of which reach the posterior margin of the pharynx; *Br. pellucidus* (WERBY, 1928), parasite of *Planesticus*

migratorius propinquus, immediately distinguished by the oral sucker which is smaller than the acetabulum.

It is more important to establish the differential diagnosis between *Br. fleuryi* and the species already appointed from *Gallus domesticus* in Europe, Africa and Asia. They are:

Brachylaemus annamensis (RAILLIET, 1924)

Brachylaemus commutatus (DIES., 1858)

Brachylaemus hawaiiensis (GUBERLET, 1928)

Brachylaemus horizawai (OSAKI, 1925)

Brachylaemus gallinus (WITENBERG, 1923)

Br. annamensis has smaller size for the acetabulum, the vitellaria only reach the genital orifice, the eggs are smaller.

Br. commutatus has round oral sucker and smaller acetabulum; the vitellaria start at the level of the bifurcal area. According to Joyeux, the testicles and suckers should be much smaller. Only Dollfus indicates a reference of Joyeux *in literis*, pointing out *Br. commutatus* with oral sucker of 600 μ and even 800 μ, in material from *Meleagris gallopavo*, of Hawaii, and of *Numida meleagris*, of Tunis. Sinitsin believes that this is the only valid species parasitic on hens, sinking therefore all others as synonyms of his *Post harmostomum commutatum*.

Br. gallinus has much smaller oral and ventral suckers and circular acetabulum, dividing the body in the ratio 1:2, whereas in *Br. fleuryi* the ratio varies between 1:2,5 and 1:35; the pharynx has smaller size, the vitellaria reach at the back only the anterior margin of the anterior testicle and the genital orifice lies in the testicular area; the eggs are wider.

Of *Br. horizawai* the large eggs, 35-38 μ × 21-22 μ, distinguish it sufficiently.

Of *Br. hawaiiensis* it is distinguished mainly by the size of the oral sucker and the acetabulum, which are, besides, almost circular, and by the diversity of the size of the testicles and ovary.

By what can be deduced from the description of the authors who admit the separation of the five species already described as parasites of *Gallus domesticus*, none of these descriptions agrees with that of the species found by us, the sizes of which are generally larger than those of any other species.

Dollfus in his monography of 1935 admits only the sub-specific category for the *Brachylaemus* of domestic *Galliformes*, recognizing, therefore, three subspecies: *Br. commutatus commutatus*, *Br. commutatus annamensis* and *Br. commutatus gallinus*; *Br. horizawai* and *Br. hawaiiensis* are considered synonims of *Br. commutatus gallinus*. *Br. commutatus commutatus* should occur only in Europe; *Br. commutatus gallinus*, distinguished owing to the vitellaria which do

not surpass the level of the posterior margin of the acetabulum, should exist in Africa, Asia and Hawaii, and *Br. commutatus annamensis* in Hue, in the Annam.

If the criterion of Dollfus, who considers also the host and the geographic distribution, is admitted, the species which we are describing would approach rather *gallinus*, not only due to its large geographic distribution, but also on account of the anterior level of its vitellaria, which are more or less coincident and due to the fact that both present characters which are common to the sub-genus *Postharmostomum* WITENBERG. Owing to the differences between these two species, which were already pointed out, we are not allowed, at present, to identify them.

Other species, the descriptions of which were compared, by the original or by means of references, as *B. furcatus* (RUD.), *B. inflatocoelum* (WITENBERG), *B. spinulosus* (HOFM.), *B. helicis* (MECKEL), *B. equans* (LOOS), *B. mesostomus* (RUD.), *B. nicolli* (WIT.), *B. arcuatus* (DUJ.), *B. attenuatus* BAER and *B. erinacei* (BLANCH), all differ from *Br. fleuryi* by morphological characters, to which should be added also the zoogeographic data.

CONCLUSION

The species of the genus *Brachylaemus* caught on hen and described as *Brachylaemus fleuryi* FONSECA, 1939, in São Paulo, Brazil, does not agree with the description of any one of the species of the genus referred up to the present, approaching, however, *Br. gallinus* (WITENBERG, 1923), being distinguished by the size of the oral sucker and acetabulum, which are much larger, by the shape of the acetabulum, which is elliptic, by the size of the pharynx, by the situation of the genital orifice and by the size of the eggs.

REFERENCES

1. *Fonseca, F. da* — Boletim Biologico 4 (Nova Série) (1):114.1939.
2. *Witenberg, G.* — Zool. Jahrb., Abt. f. Syst., usw., 51(2/3):167.1925.
3. *Sinitsin, D.* — Ztschr. f. Parasitenk. 3:786.1931.
4. *Dollfus, R. Ph.* — Ann. de Parasit. Hum. et Comp. 12:551.1934 et 13:52.1935.

616.928:614.541

CONSERVAÇÃO DA VITALIDADE DO VIRUS AMARILICO INOCULADO NO TESTICULO DE COBAIAS (*) - (**)

POR

FLAVIO DA FONSECA

Uma analise das tecnicas de cultura e inoculação utilizada em bacteriologia, micologia, parasitologia e principalmente no estudo dos virus permite concluir que o tecido seminal constitúi meio excelente para o desenvolvimento de varias especies parasitarias.

Como base para o cultivo de virus em culturas de tecido tem sido utilizado o testiculo por varios pesquisadores. Andrewes (1) e Topacio e Hyde (2), obtiveram por êsse meio a cultura do virus III, a qual é, entretanto, negativa quando empregadas celulas do figado, baço, rim e medula ossea. O virus do herpes foi tambem cultivado em celulas de testiculo de coelho por Andrewes (3). O virus da pseudoraiva, segundo Traub (4), e o virus vacinico, segundo Harde (5), são igualmente passiveis de cultivo em presença de celulas testiculares. A propria cultura do virus amarilico foi já obtida por Haagen e Theiler (6) e por Haagen (7), utilizando culturas de tecido seminal de coelho e de cobaio.

As reações escrotais, devidas à localização na vaginal de *Pfeifferella mallei* e de algumas das muitas especies de *Rickettsia* são bastante conhecidas.

(*) A presente nota já se achava elaborada e tinha sido entregue para publicação nos Comptes Rendus de la Société de Biologie, quando nos foi dado lêr, no Tropical Diseases Bulletin 35(7):496.1938, uma referencia a um trabalho de Hugh H. Smith sobre a persistencia do virus amarilico inoculado nos testiculos de camondongos brancos. Êsse trabalho fôra publicado no Amer. Journ. Trop. Med. 18(1):77.1938, cujo exemplar se extraviara antes de chegar à bibliotéca do Instituto Butantan, que ainda o não possúi, razão pela qual escapou à nossa revisão bibliografica. Nele refere Smith ter efetuado 20 passagens com virus Asibi, 42 com virus francês, além de outros, observando maximo da concentração do virus no 7.° dia e persistencia até mais ou menos o 20.°.

(**) Trabalho realizado no Instituto Butantan em colaboração com o extinto Serviço Especial de Defeza contra a Febre Amarella, a cujo Diretor, Dr. H. de Beaurepaire Aragão, apresentamos agradecimentos.

A inoculação do *Treponema pallidum* em coelhos, a de *Leishmania tropica* e de *Leishmania brasiliensis* em camondongos brancos, a de cogumelos das blastomycoses em cobaias, da mesma maneira que o tropismo testicular demonstrado pelas larvas de *Porocephalus clavatus* administradas por via oral a cobaias (neste volume), testemunham igualmente constituirem as celulas seminais um ambiente propicio ao desenvolvimento de muitos parasitas fóra dos seus hospedeiros naturais.

Baseado no conhecimento destes fatos empreendêmos pesquisas tendentes a experimentar a via testicular como porta de entrada do virus amarilico em algumas especies animais, tendo utilizado camondongos brancos da estirpe Swiss, cobaias e gambá (*Didelphys aurita*).

Não tinhamos ainda nesta ocasião conhecimento dos trabalhos de Lloyd e Mahaffy (8), que já haviam verificado a possibilidade de manter-se e multiplicar-se o virus amarilico no testiculo de camondongos sensiveis durante um lapso de tempo maximo de 120 horas. Estes pesquisadores conseguiram obter até 9 passagens em serie, inoculando virus neurotropico por via testicular, não tendo, todavia, conseguido reisolar o virus em duas tentativas após o decurso de 140 horas, falhando ás vezes a inoculação mesmo com 120 horas apenas.

As observações de Lloyd e Mahaffy visaram tão somente o estudo do comportamento do virus inoculado em testiculo de camondongo, com vistas sobretudo á obtenção de amostra orquidotropica passivel de futura aplicação em tecnica de vacinação, não tendo interessado a êsses pesquisadores conhecer o prazo maximo de persistencia do virus inoculado.

Em nosso trabalho visava a finalidade primaria verificar o comportamento do virus inoculado por esta via em diversas especies animais nas quais já fossem conhecidos os resultados da inoculação por vias mais comuns. Secundariamente depois de observada a persistencia da vitalidade do virus no testiculo de cobaias, tivemos em mira conseguir processo facil de conservação da atividade do virus amarilico durante prazo mais ou menos longo sem necessidade de passagens frequentes ou de utilização da tecnica de secagem em vacuo e a baixa temperatura, só possivel em laboratorios dotados de aparelhagem adaptada a êsse processo.

Além do de Lloyd e Mahaffy, o unico trabalho que conhecemos em que é feita referencia á pratica de inoculações testiculares de virus amarilico é o de Cowdry e Kitchen (9), que apenas visaram a pesquisa de inclusões nucleares em tecidos diretamente inoculados com o virus, não tendo siquer verificado a vitalidade do virus introduzido por essa via.

O material utilizado constou de amostra do virus Asibi e da amostra neurotropica francêsa, ambas obtidas da Fundação Rockefeller pelo dr. Henrique Aragão, diretor do extinto Serviço Especial de Defesa contra a Febre Amarela, ao qual consignamos o nosso agradecimento. A amostra Asibi foi por nós secada em

alto vacuo segundo a tecnica de Sawyer, Lloyd e Kitchen (10) e utilizada em diluição a 1 : 10. O virus neurotropico foi mantido quer por passagens sucessivas em camondongos sensiveis, quer seco em alto vacuo, sendo utilizado material conservado por ambos os processos diluido a 1 : 20.

Experiencia I — 6 camondongos da estirpe Swiss foram inoculados a 27-IV-38, por via testicular, com 0,1 cc. de virus Asibi a 1 : 10 em solução fisiologica. Sacrificados a 9-V, foi feita emulsão dos testiculos sendo inoculados por via cerebral seis camondongos com 0,03 cc., os quais não apresentam sintomas durante mais de 30 dias.

Experiencia II — *Didelphys aurita* 1815, inoculado com 0.25 cc. de diluição a 1 : 10 de virus Asibi em cada testiculo, a 27-IV-38. Não apresentou sintoma algum durante todo o tempo em que foi observado, nem mesmo virus circulante, pesquisado a 30-V e a 4-V, até 11-V, quando o animal foi sacrificado. Inoculado o produto da maceração dos testiculos em seis camondongos suissos, na dose de 0,03 cc., não foram observados sintomas até mais de 20 dias depois da inoculação.

Cobaia 1741 — Inoculada a 20-V-38 com 0.5 cc. de virus neurotropico a 1 : 20 em cada testiculo. Sangrada e sacrificada a 23-V, não foi obtido isolamento do virus circulante, sendo positiva a inoculação do tecido testicular em camondongos, apresentando-se estes doentes a partir do 4º dia.

Cobaia 1724 — Inoculada a 27-IV-38 com 0.25 cc. de virus Asibi seco diluido a 1 : 10 em cada testiculo. Sangrada a 30-IV e 4-V não foi obtido isolamento do virus. Sacrificada a 11-V, foi o macerato de testiculos inoculado por via cerebral em 6 camondongos, morrendo os primeiros a 17-V, tendo sido reisolado virus.

Cobaia 1740 — Inoculada a 20-V-38 com 0.5 cc. de virus neurotropico a 1 : 20 em cada testiculo. Sangrada a 23-V não foi obtido isolamento do virus. Sacrificada a 9-VI-38, foi feita passagem de macerato de testiculos para cerebro de camondongos, que apresentaram paralisia tipica a 14-VI-38.

Cobaias 1747 e 1748 — Inoculadas a 24-V-38 com 0.5 cc. de emulsão de virus neurotropico a 1 : 20 em cada testiculo. Sacrificadas a 11-VII-38 foi reisolado virus após inoculação do macerato de testiculos em camondongos. Nestes dois animais o virus permaneceu, portanto, ativo durante 48 dias.

De uma outra cobaia do mesmo lote que as precedentes inoculada pela mesma via e com o mesmo material a 24-V e sacrificada a 25-VI, não foi conseguido o reisolamento do virus, o que demonstra que a conservação da vitalidade não é sempre observada.

CONCLUSÕES

1.ª Não foi possivel reisolar o virus Asibi 12 dias depois de inoculado nos testiculos de camondongos brancos e de *Didelphys aurita*.

2.ª Foi observada persistencia de vitalidade do virus Asibi 14 dias após inoculação em testiculos de cobaia.

3.ª Foi reisolado virus neurotropico ativo até 48 dias depois da inoculação em testiculos de cobaia, parecendo, entretanto, inconstante a persistencia da vitalidade durante tão longo lapso de tempo.

4.ª A analogia de comportamento em relação ao desenvolvimento dos virus, observada entre as celulas seminais e os tecidos embrionarios, deve estar, provavelmente, ligada à grande atividade de reprodução, esta devida ao tipo identico de metabolismo (11), que lhes é, aliás, comum às celulas tumorais.

BIBLIOGRAFIA

1. *Andrewes C. H.* — Brit. Journ. Exper. Path. **10**:188 et 273.1929.
2. *Topacio, T. & Hyde, R. R.* — Amer. Journ. Hyg. **15**:98.1932.
3. *Andrewes, C. H.* — Journ. Path. a. Bact. **33**:301.1930.
4. *Traub, E.* — Journ. Exper. Med. **58**:663.1933.
5. *Harde, E. S.* — C. R. Soc. Biol. **78**:545.1915.
6. *Haagen, E. & Theiler, M.* — Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med. **29**:435.1932 *et* Centralbl. f. Bakt. I. Orig. **125**:145.1932.
7. *Haagen, E.* — Centralbl. f. Bakt. I. Orig. **128**:13.1933 *et* Arch. f. Zellforsch. 18:405.1934.
8. *Lloyd, W. D. & Mahaffy, A.* — Journ. Immunology **25**:471.1933.
9. *Cowdry, E. V. & Kitchen, S. F.* — Amer. Journ. Hyg. **11**(2):227.1930.
10. *Sawyer, W. A.; Lloyd, W. D. & Kitchen, S. F.* — Journ. Exper. Med. **51**(1):1.1929.
11. *Warburg,* — *Cit. de Martins, T.* — Glandulas sexuaes e hypophyse. S. Paulo 1937:493.

(Trabalho da Secção de Parasitologia e Protozoologia do Instituto Butantan. Dado à publicidade em Junho de 1939).

PERSISTANCE DE LA VITALITÉ DU VIRUS AMARIL INOCULÉ DANS LES TESTICULES DU COBAYE (*)-(**)

PAR

FLAVIO DA FONSECA

La connaissance de la technique de culture et d'inoculation nous permet de constater facilement que le tissu testiculaire constitue un excellent millieu pour le développement de plusieurs espèces parasitaires.

Le virus III, qui n'est pas cultivable en présence de cellules du foie, de la rate, du rein et de la moelle osseuse, le virus de l'herpes, le virus de la pseudo-rage, celui du vaccin, de même que le virus de la fièvre jaune, ont déjà été cultivés dans des cultures de tissu testiculaire.

Les réactions scrotales dues à l'inféction par *Pfeifferella mallei* et par certaines *Rickettsia* se localisant dans la vaginale, sont bien connues.

L'inoculation du *Treponema pallidum* aux lapins, celle de *Leishmania tropica* aux souris, celle des champignons des blastomycoses aux cobayes, de même que le tropisme testiculaire des larves de *Porocephalus clavatus* administrés *per* os aux cobayes (voir ce volume), temoignent aussi les bonnes conditions offertes par les cellules séminales au dévéloppement parasitaire.

C'est en nous basant sur ces faits qui nous avons entrepris des expériences tendantes à éprouver le tissu testiculaire comme voie d'introduction du virus amaril dans l'organisme de quelques espèces animales.

(*) Cette note avait déjà été envoyée pour être publiée aux C. R. Soc. Biol. de Paris quand nous avons eu l'occasion de lire une référence à un article de Hugh H. Smith, parue dans le Trop. Dis. Bull. 35(7):496.1938, dans lequel cet auteur signalait la persistence du virus amaril inoculé dans les testicules des souris blanches. L'original de ce travail fut publié dans l'Am. Jour. Trop. Med. 18(1):77.1938, dont le numero, perdu à la Poste, n'est pas encore arrivé a la bibliothèque de l'Institut Butantan, ayant ainsi echapé à notre révision de la bibliographie. Dans sa publication Smith signale avoir obtenue jusqu'a 20 passages avec du virus Asibi et 42 avec du virus français, ayant constaté une plus grande concentration du virus au 7ème jour et sa persistance jusqu'aux environs du 20ème.

(**) Travail réalisé avec la collaboration de l'Institut Butantan e du Service Especial de Défense contre la Fièvre Jaune.

Nous n'avions pas encore à cette epoche connaissance des recherches de Lloyd et Mahaffy (1), qui, tâchant d'obtenir une souche orchidotrope de virus amaril qui leur permit d'obtenir un vaccin depourvu de danger pour l'espèce humaine, avaient inoculé des souris blanches dans le testicule. Ces savants ont constaté que le virus ainsi inoculé conservait sa vitalité pendant 120 heures au maximum, un délai de 140 et même quelques fois de 120 heures n'ayant plus fourni de résultats positifs. Neuf passages en série de testicule à testicule ont été réalisés chez les souris.

Un autre travail que nous avons rencontré en percourant la littérature et où est citée l'inoculation testiculaire du virus amaril est celui de Cowdry et Kitchen (2), qui ont seulement recherché des inclusions nucléaires dans des cellules des tissus inoculés directement, sans avoir même vérifié la persistance de la vitalité du virus introduit par cette voie.

Dans ces recherches préliminaires nous avons utilisé des souris de la souche Swiss, des cobayes et une sarigue, *Didelphys aurita*.

Les virus utilisés furent le virus Asibi et la souche neurotrope française obtenues de la Fondation Rockefeller par le D.eur Henrique Aragão, Directeur du Service Spécial de Défense contre la Fièvre Jaune, que nous tenons à remercier. La souche Asibi fut desséchée dans le vide selon la technique de Sawyer, Lloyd et Kitchen (3) et utilisée à la dilution de 1 :10. Le virus neurotrope fut aussi desseché dans le vide et entretenu par des passages successifs sur des souris blanches à la dilution de 1 :20.

Expérience I — Six souris furent inoculées par voie testiculaire le 27.IV.38 avec 0 cc. 1 d'une dilution au dixième de virus Asibi. Sacrifiées le 9.V le virus ne put être réisolé par l'inoculation cérébrale du produit de broyage des testicules à des souris neuves.

Expérience II — Un *Didelphys aurita* (No. 1715) inoculé le 27.IV.38 avec 0 cc. 25 d'une dilution au dixième de virus Asibi dans chaque testicule, n'a pas presenté des symptômes de la maladie, ni du virus circulant, qui fut recherché le 30-IV et le 4 et le 11-V. Sacrifié le 11-V, le produit du broyage fut inoculé par voie cérébrale à la dose de 0 cc. 03 à six souris, qui n'ont pas manifesté des symptômes de maladie pendant 20 jours d'observation.

Expérience III — Cobaye 1724, inoculé le 27-IV, avec 0 cc. 25 de virus Asibi au dixième dans chaque testicule ne présente pas de virus circulant recherché le 30-IV et le 4-V. Sacrifié de 11-V le virus fut réisolé après l'inoculation du produit de broyage des testicules à six souris, les premiers mourant le 17-V.

Expérience IV — Un cobaye (No. 1741) inoculé le 20-V-38 avec 0 cc. 5 de virus neurotrope à la dilution de 1 :20 dans chaque testicule, n'avait pas de virus circulant le 23-V; sacrifié ce jour même on réisola du virus par l'inoculation cérébrale du tissu testiculaire à des souris.

Expérience V — Cobaye 1740, inoculé le 20-V avec 0 cc. 5 de virus neurotrope à la dilution de 1 :20 dans chaque testicule. La saignée suivie d'inoculation pratiquée le 23-V n'a pas demontré l'existence de virus en circulation. L'inoculation donna une paralysie typique qui le 14-VI.

Expérience VI — Deux cobayes (Nos. 1747 et 1748) ont été inoculés le 24-V-38 avec 0 cc. 5 de virus neurotrope dilué au vingtième dans chaque testicule. Ils furent tués le 11-VII-38, on est parvenu à réisoler le virus du produit de broyage des testicules de ces deux animaux par l'inoculation à des souris. Il fut donc observée dans ces deux cas une persistance de vitalité du virus de 48 jours.

Des résultats négatifs furent obtenus chez un autre cobaye du même lot VI, inoculé avec du virus neurotrope le 24-V et sacrifié le 25-V, ce qui semble démontrer que la vitalité ne persiste pas dans tous les cas.

CONCLUSIONS

1ère — Le virus Asibi semble ne pas conserver sa vitalité quand il est inoculé par voie testiculaire pendant 12 jours chez la souris et chez *Didelphys aurita*.

2ème — Une persistance de vitalité de 14 jours fut verifié pour le virus Asibi inoculé aux testicules d'un cobaye.

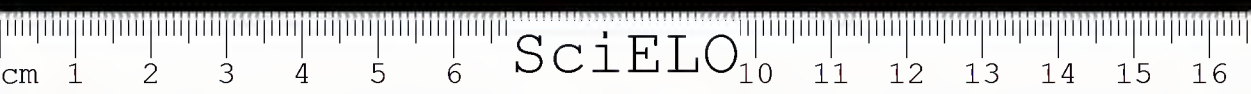
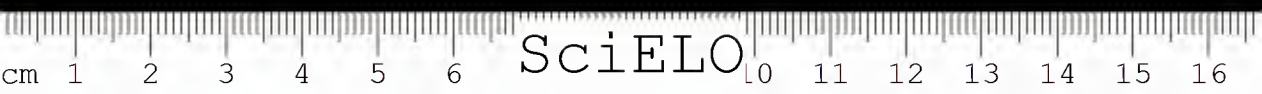
3ème — Du virus neurotrope actif fut rencontré dans les testicules de cobayes inoculés 48 jours auparavant, la conservation de la vitalité dans ce délai semblant être inconstante, puisque dans une autre expérience le réisolement échoua l'inoculation après 30 jours.

4ème — L'analogie qu'on observe entre le comportement des cellules séminales et celui des tissus embryonnaires à l'égard du developpement des virus, doit être probablement rattachée à la grande activité reproductrice, qui est en rapport avec le type identique de métabolisme (WARBURG (4)), qui leurs est dailleurs commun aux cellules tumorales.

BIBLIOGRAFIA

1. *Lloyd, W. D. & Mahaffy, A.* — Journ. Immunology 22:471.1933.
2. *Coudry, E. V. & Kitchen, S. F.* — Amer. Journ. Hyg. 11(2):227.1930.
3. *Sawyer, W. A.; Lloyd, W. D. & Kitchen, S. F.* — Journ. Exper. Med. 51(1):1.1929.
4. *Warburg, — Cit. de Martins, T.* — Glandulas sexuaes e hypophyse, S. Paulo, 1937:493.

(Trabalho da Secção de Parasitologia e Protozoologia do Instituto Butantan. Dado à publicidade in C. R. Soc. Biol. 129(31). 1938).

616.928:614.541

HIPERSENSIBILIDADE DE UM ROEDOR BRASILEIRO AO VIRUS AMARILICO NEUROTROPICO (*)

POR

FLAVIO DA FONSECA

Em conseqüencia de observações sobre a sensibilidade de varias especies animais ao virus amarilico verificou Findlay, em 1934 (1), que o ouriço da Europa, *Erinaceus europeus*, inoculado por via cerebral com virus neurotropico, não somente apresenta lesões de encefalite mas tambem necrose do figado, o que não acontece a mais animal algum dos sensiveis ao virus amarilico. Inoculados com virus pantropico, verificaram Findlay e Clarke (2), que morreram 100% dos 28 animais experimentados.

Posteriormente, divulgaram os mesmos pesquisadores (3) que a sensibilidade de *Erinaceus europeus* é tal que a propria inoculação do virus neurotropico, praticada por via subcutanea ou intraperitoneal, é sempre seguida de encefalite fatal, além de necrose do figado, aparecendo os sintomas do 6.º ao 11.º dia. A sensibilidade é, portanto, neste caso, ainda maior do que a dos *rhesus*, que apenas em cerca de 30% das inoculações morrem de encefalite quando a via de introdução do virus neurotropico é extraneural, só 50% apresentando reação febril (4). Difere ainda o comportamento do *Erinaceus europeus* dos restantes animais sensiveis pelo fato de persistir o virus, após a morte, no figado, cerebro, rins, baço e suprarenais, embora só raramente ocorra no sangue.

Estas verificações apresentam interesse consideravel, pois sendo a sensibilidade do *Erinaceus europeus* maior do que a do proprio *rhesus*, possibilita o emprego desse animal como reativo para determinação do grão de atividade dos virus utilizados na vacinação humana, como bem o assinala Thiroux (5) em trabalho recente. De fato, o virus amarilico atenuado por culturas em embrião descerebrado de galinha (virus 17 D) pode ser controlado pela inoculação em *Erinaceus europeus*, animal hipersensivel, no qual, entretanto, este virus, introduzido

(*) Trabalho realizado no Instituto Butantan com a colaboração do Serviço Especial de Defesa contra a Febre Amarela.

por via subcutanea, não mais causa infecção mortal, segundo o verificaram Theiler e Smith (4).

Tambem o ouriço sudanez (*Erinaceus pruneri*) teve comprovada a sensibilidade à inoculação com virus Asibi, o que foi observado por Findlay, Hewer e Clarke (6).

Na fauna neotropica não são encontradas especies do genero *Erinaceus* ou proximas a este. Não é, todavia, demais lembrar que entre os ouriços europeus e os sul-americanos nenhuma afinidade zoologica existe, o unico traço comum sendo a existencia de espinhos... De fato, aqueles pertencem à ordem *Insectivora,* familia *Erinaceidae,* genero *Erinaceus* e estes á ordem *Rodentia,* familia *Coendidae,* genero *Coendu,* sendo por nós demonstrada em outra nota, com P. Artigas (7), a insensibilidade da especie *Coendu prehensilis* à inoculação subcutanea do virus Asibi.

Outro animal que apresenta igualmente receptividade exaltada ao virus amarilico é o camondongo africano *Mus musculus azoricus,* que Laigret (8) verificou apresentar paralisia consecutiva à inoculação intraperitoneal de um virus amarilico que, por analogia com as experiencias relatadas no mesmo trabalho sobre o comportamento de *Mus musculus musculus,* se deduz ser o neurotropico.

Constituiu, portanto, para nós motivo de grande interesse poder verificar em um pequeno roedor que o Instituto Butantan recebera vivo de Rosario, Estado do Rio Grande do Sul, este mesmo grão de hipersensibilidade à inoculação intracerebral do virus neurotropico francês, recebido da Fundação Rockefeller através do Serviço Especial de Defesa contra a Febre Amarela do Estado de São Paulo. Trata-se de um pequeno roedor (Fig. 1), da familia *Octodontidae,* genero *Ctenomys.* A diagnose especifica não foi ainda precisada, havendo duas especies assinaladas no Brasil, segundo o catalogo de Trouessart: *Ctenomys minutus* NEHRING e *Ctenomys brasiliensis* BLAINVILLE (sin.: *C. natteri* WAGNER).

Este pequeno roedor, que chamára já a atenção de Darwin em sua estadia na America do Sul, recebe do povo a denominação onomatopaica de *tuco-tuco,* devido ao grito que emite com freqüencia. Escava galerias subterraneas danificando as plantações, principalmente as de batatas, de que são avidos. Os dois especimens por nós recebidos eram de indole mansa, facilmente manejaveis, prestando-se bastante à manipulação em laboratorio.

1.ª *experiencia* — *Ctenomys* sp., 1705 — A 22-4-38 foi inoculado por via cerebral com 0 c c. 5 do virus neurotropico a 1:20 proveniente de camondongos paraliticos sacrificados no momento. A 30-4 foi sangrado para pesquisa do virus circulante, não sendo concludente o resultado desta verificação por ter morrido um camondongo, no 7.º dia, do qual não foi feita passagem; os cinco restantes estavam normais no 22.º dia. A 4-5-38 amanheceu doente, paretico, o roedor 1705, tendo sido sangrado e sacrificado, sendo feitas inoculações em camondongos com sangue, cerebro e figado. Os camondongos inoculados com sangue

não reagiram até o 20.º dia. Dos seis inoculados com figado quatro estavam normais no 20.º dia, porém, um teve paralisia tipica no 16.º dia; a passagem realizada com o cerebro deste camondongo matou seis com paralisia tipica do 5.º ao 6.º dia, havendo doentes desde o 4.º dia; com este virus reisolado do figado foram feitas mais tres passagens, comportando-se o virus normalmente.

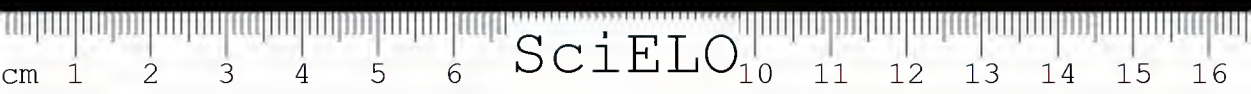
Dos seis camondongos inoculados com cerebro do roedor 1705, um morreu no dia seguinte ao da inoculação, outro no 4.º dia e dois estavam normais no 20.º dia; de um doente no 9.º dia (ainda sem paralisia) foi feita passagem de cerebro, morrendo os seis camondongos da passagem do 4.º ao 6.º dias. Com o virus reisolado do cerebro foram feitas seis passagens, comportando-se o virus normalmente.

Ctenomys, sp., 1704 — Inoculado a 24-5-38 por via subcutanea com 0c.c.5 do virus neurotropico. A 3-VI amanheceu com dificuldade de locomoção, tornando-se a paresia mais pronunciada no dia seguinte, quando foi sacrificado, sendo feita inoculação de cerebro, figado, baço, rim e sangue em camondongos. Dos camondongos inoculados com este material alguns morreram em prazo mais ou menos normal; como, porém, não puderam ser feitas novas passagens, a observação ficou incompleta.

Tendo sido, além disso, cedida nessa ocasião à Fundação Rockefeller a maior parte dos camondongos brancos de estirpe Swiss da criação do Instituto Butantan, foram, nesta experiencia, ao contrario da anterior, utilizados camondongos de raça menos sensivel ao virus amarilico, não sendo, portanto, possivel negar com segurança a existencia do virus nos orgãos inoculados.

O Instituto Butantan empenha-se neste momento em receber maior numero de exemplares de *tuco-tuco* para completar as verificações iniciadas sobre a sensibilidade ao virus neurotropico e para experimentar com o virus Asibi, ao qual, *a priori*, quasi se pode assegurar sensivel a especie em estudo.

Das duas experiencias já realizadas pode-se todavia concluir tratar-se de um roedor mais sensivel ao virus amarilico do que os camondongos brancos, si bem que a sensibilidade demonstrada não tenha sido tamanha quanto à observada em *Erinaceus europæus*. De fato, a pesquisa anatomo-patologica do figado, realizada no primeiro pelo dr. João Montenegro, anatomo-patologista do Serviço Especial de Defesa contra a Febre Amarela, e no segundo pelo dr. Moacyr Amorim, do Instituto Butantan, apenas revelou degeneração gorda do figado, sem necrose.

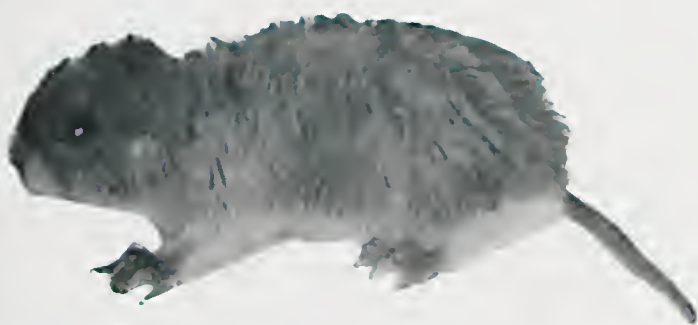
Não tendo sido possivel conduzir a segunda experiencia com o rigor desejavel, apenas podemos suspeitar ser o animal sensivel à inoculação subcutanea do virus neurotropico, o que o poria, em relação à sensibilidade à febre amarela, pelo menos em pé de igualdade com *Mus musculus azoricus*.

Quanto à verificação da presença do virus no figado, apesar da ausencia do virus no sangue, nada ha de extranhavel, tendo já sido feita observação semelhante em *Erinaceus europeus*.

RESUMO

Em *Ctenomys* sp. do Brasil foi observada paralisia, ocorrencia do virus no figado e ausencia no sangue, após inoculação do virus amarilico neurotropico por via cerebral. A inoculação do mesmo virus por via subcutanea determinou paresia de um outro *Ctenomys*, do qual não foi todavia possivel reisolar o virus.

(Trabalho da Secção de Parasitolog.a e Protozoologia do Instituto Butantan. Dado à publicidade em Junho de 1939).

Fig. 1
Ctenomys sp.

616.928:614.541

L'HYPERSENSIBILITÉ D'UN RONGEUR BRÉSILIEN AU VIRUS AMARIL NEUROTROPE (*)

PAR

FLAVIO DA FONSECA

Dans ses recherches sur la sensibilité de plusieurs espèces animales au virus amaril, Findlay a pu constater (1) que le hérisson européen, *Erinaceus europeus*, inoculé par voie cérébrale avec du virus neurotrope présente non seulement de l'encéphalite, mais aussi de la nécrose du foie. Findlay et Clarke (2) ont observé une mortalité de 100% parmi 28 hérissons inoculés avec du virus pantrope.

Ces mêmes auteurs ont vérifié ultérieurement (3) que la sensibilité du hérisson est telle que l'inoculation du virus neurotrope pratiquée par une des voies souscutanée ou intrapéritonéale est toujours suivie d'encéphalite et de nécrose du foie. La sensibilité de cet animal à l'inoculation extraneurale du virus neurotrope est donc plus prononcée que celle des rhesus (*Macaca mulata mulata*), pour lesquels l'encéphalite est seulement observée à 30% environ des cas (4).

L'intérêt pratique de cette constatation porte surtout sur la possibilité d'employer le hérison comme test pour déterminer le degré d'activité des virus utilisés en vaccination humaine, comme l'a noté tout récemment Thiroux (5). En effet, le virus amaril atténué par la culture en présence d'embryon de poulet sans encéphale (virus 17 D), actuellement employé en vaccination humaine, ne détermine plus la mort du hérisson après l'inoculation souscutanée, comme l'a démontré Smith (4).

Le hérisson du Soudan, *Erinaceus pruneri*, est aussi sensible à l'inoculation du virus Asibi, d'après Findlay, Hewer et Clarke (6).

La faune néotropique ne présente pas d'espèce appartenant au genre *Erinaceus*, les hérissons européens n'ayant aucune affinité zoologique avec les sud-

---

(*) Travail réalisé à l'Institut Butantan avec la collaboration du Service Especial de Défense contre la Fièvre Jaune.

americaines; les premiers appartiennent à l'ordre *Insectivora*, famille *Erinaceidae*, genre *Erinaceus* et les derniers à l'ordre *Rodentia*, famille *Coendidae*, genre *Coendu*. L'espèce *Coendu prehensilis* n'est pas sensible a l'inoculation souscutanée du virus Asibi, comme nous le démontrons avec P. Artigas dans une autre note (7).

Un autre animal qui présente également une réceptivité exaltée à l'égard du virus amaril est *Mus musculus azoricus*, qui Laigret (8) vérifia mourrir en paralysie à la suite de l'inoculation intrapéritonéale d'un virus présumablement neutro-

Chez un rongeur brésilien dont l'Institut Butantan avait reçu vivants deux exemplaires de Rosario, État de Rio Grande do Sul, nous avons pu également constater cette même réceptivité à la suite de l'inoculation du virus amaril neurotrope.

C'est un petit rongeur appartenant à la famille *Octodontidae*, genre *Ctenomys*, dont la diagnose specifique n'a pas encore été établie. D'après le catalogue de mammifères de Trouessart, il n'y a que deux espèces attribuées au Brésil: *Ctenomys minutus* NEHRING et *C. brasiliensis* BLAINVILLE (syn.: *C. natteri* WAGNER).

Ce rongeur, de taille un peu plus mince qu'un *Epimys norwegicus*, à petite queue, très connu par les citations de Darwin dans son voyage en Amérique du Sud, porte le nom vulgaire onomatopéique de "touc-touc" dû aux cris qu'il émet fréquemment. Ce sont des rats très faciles à manier au laboratoire, qui creusent des galeries dans les champs et surtout dans les plantations de patâtes, qu'ils mangent avidement.

Le premier des *Ctenomys* (1705) fut inoculé le 22-4-38 par voie cérébral avec Oc.c.5 du virus neurotrope dilué à 1:20, provenant de souris paralytiques sacrifiées pour cette occasion. Le 30-4 il fut saigné et le sang inoculé à six souris par voie cérébrale, dont une seule mourut au 7ème jour sans qu'il fût possible de l'observer ou de pratiquer des passages. Le 4-5 le *Ctenomys* 1705 présentant des symptômes de paralysie fut sacrifié et des inoculations de sang, de foie et de cerveau furent pratiquées. Des six souris inoculées avec du sang une mourut le 2ème et une autre le 3ème jour après l'inoculation; les autres ne présentèrent aucun symptôme jusqu'au 26ème jour.

Des six souris inoculées avec du foie une seule présenta de la paralysie le 16ème jour; le passage pratiqué avec du cerveau de cette souris tua six autres du 5ème au 6ème jour, les symptômes ayant apparu dès le 4ème jour. Trois autres passages pratiqués avec ce virus réisolé du foie ont montré une marche régulière du virus.

L'inoculation du cerveau du *Ctenomys* 1705 tua une souris au 4ème jour, deux autres furent malades le 9ème jour, mais une se retablit et l'autre fut sacrifiée pour des passages. D'un groupe de six souris inoculées avec le cerveau

de celle-ci toutes sont mortes paralysées du 4ème ou 5ème jour. Avec le virus ainsi réisolé on a effectué plus six passages par groupes de six souris, toujours avec un résultat régulier.

Le second *Ctenomys* (1704) fut inoculé le 24-VI-38 par voie souscutanée avec 0cc.5 de virus neurotrope à la dilution de 1:20. Le 4-VI l'animal présentant de la parésie, ne se tenant plus debout, fut sacrifié, des inoculations furent faites avec du sang, du foie, du rein, de la rate et du cerveau. Exceptué les groupes de souris inoculées avec du foie et de la rate, dans tous les autres groupes a constaté la mort de quelques souris dans des délais à peu près normaux. On n'a pas fait de passages de cerveau de ces souris mortes de sorte qu'on ne peut conclure définitivement sur l'infectiosité du material inoculé.

La difficulté d'obtenir d'autres *Ctenomys* nous a jusqu'ici empêché de poursuivre l'étude de son comportement à l'égard du virus amaril. Des deux expériences déjà realisées on peut néanmoins conclure qu'il s'agit d'un rongeur dont la sensibilité au virus de la fièvre jaune est plus grande que celle des souris blanches, bien qu'e e ne soit pas si elevée que celle du hérisson européen, puisque l'examen histologique du foie, effectué chez le premier par le Deur J. Montenegro et chez le second par le Deur M. Amorim, aux quels nous tenons à remercier, démontra seulement de la dégenérescence graisseuse, en l'absence de lésions de necrose.

La deuxième expérience n'ayant pas pu être suivie de plus près, nous laisse seulement suspecter la sensibilité de l'animal à l'inoculation souscutanée de virus neurotrope, ce qui démontrerait qu'il est au moins si sensible que *Mus musculus azoricus*.

La constatation, dans la première experience, de la présence du virus dans le foie en l'absence de virus circulant, après l'inoculation cérébrale de virus neurotrope, n'a rien de surprenant, la même vérification ayant été faite chez *l'Erinaceus europeus*.

BIBLIOGRAFIA

1. *Findlay, G. M.* — Trans Roy. Soc. Trop. Med. a. Hyg. **27**(5):437.1934.
2. *Findlay, G. M. & Clarke, L. P.* — Trans. Roy. Soc. Trop. Med. a. Hyg. **28**(2):193.1934.
3. *Findlay, G. M. & Clarke, L. P.* — Trans. Roy. Soc. Trop. Med. a. Hyg. **28**(3):335.1934.
4. *Theiler, M. & Smith, H. H.* — The Jl. Exp. Med. **65**(6):787.1937
5. *Thirour, A.* — Presse Médicale **45**(76):1349.1937.
6. *Findlay, G. M.; Hewer, T. F. & Clarke, L. P.* — Trans. Roy. Soc. Trop. Med. a. Hyg. **28**(4):413.1935.
7. *Fonseca, F. da & Artigas P.* — Compt. Rend. Soc. Biol. **129**:1134.1938.
8. *Laigret, J.* — Compt. Rend. Acad. Sc. **196**(7):508.1933.

(Trabalho da Secção de Parasitologia e Protozoologia do Instituto Butantan. Dado à publicidade in C. R. Soc. Biol. 129(34). 1938).

616.928:614 541

SENSIBILIDADE DO GATO DOMESTICO AO VIRUS AMARILICO NEUROTROPICO (*)

POR

FLAVIO DA FONSECA & PAULO ARTIGAS

Em 1930 foi pela primeira vez pesquisada a sensibilidade de gatos ao virus amarilico, pelo nosso sempre lembrado companheiro de trabalho Lemos Monteiro (1). Suas pesquisas, que visavam a verificação da possibilidade da existencia de depositarios naturais do virus da febre amarela, redundaram na descoberta de certa sensibilidade deste felideo ao virus em questão. De fato, a inoculação por via peritoneal de 2 ccs. de sangue de *rhesus* infetado com virus Asibi, permitiu observar elevação termica, mostrando-se o sangue infetante para *rhesus* no 12.º dia, concedendo ainda imunidade ao mesmo animal no 30º dia. Outro gato inoculado por via subcutanea não apresentou sintomas, mas o seu sangue mostrou-se dotado de propriedades imunizantes no 4º e no 30º dias. A inoculação cerebral de sangue de *rhesus* não conferiu, entretanto, ao gato infecção tipica.

Aos resultados positivos obtidos por Lemos Monteiro opõem-se os negativos recentemente divulgados por Findlay (2) e por Nicolau e Baffet (3), os quais trabalhando com virus neurotropico inoculado por via cerebral em gatos jovens não obtiveram infecção, não tendo além disso estes ultimos pesquisadores observado lesões histo-patologicas identicas às por eles encontradas em cães inoculados com o mesmo virus.

Esta verificação da insensibilidade do gato ao virus neuorotropico inoculado por via cerebral assinalada pelos autores supracitados surpreendeu-nos, pois não só a revista bibliografica por nós realizada e publicada em trabalho anterior, demonstrou ser mais freqüente a sensibilidade de animais ao virus neurotropico do que ao pantropico, como tambem as pesquisas originais que levámos a efeito (3) confirmam este ponto de vista, parecendo, portanto, *a priori*, pouco provavel que

(*) Trabalho do Instituto Butantan, realizado com a colaboração do antigo Serviço Especial de Defesa contra a Febre Amarela do Estado de S. Paulo.

um animal sensivel ao virus visceral, como o afirma Lemos Monteiro, fosse insensivel ao virus neurotropico, como o asseguram os autores citados.

Para derimir a divergencia entre esses resultados, instituimos uma serie de experiencias de inoculação do virus neurotropico (F 654) e do virus Asibi (No. 40.087 + 4.061) recebidos da Fundação Rockefeller através do extinto Serviço Especial de Defesa contra a Febre Amarela do Estado de S. Paulo, a cujo diretor, dr. H. B. Aragão, apresentamos os nossos agradecimentos.

Todas as experiencias foram realizadas com gatos domesticos jovens, com poucos meses de idade, com uma unica exceção em que foi utilizado um animal adulto. A proveniencia dos felideos foi sempre S. Paulo, Capital.

Gato 1653 — Inoculado a 11-2-38 por via cerebral com 0 cc. 1 de emulsão a 1:20 de cerebro de camondongos paraliticos. A temperatura de 30°3 a 30°7 apresentada nos quatro primeiros dias, baixou a 35° e fração nos dias seguintes, apresentando o animal paralisia do trem posterior a 19-2 (Fig. 1), quando foi sacrificado. A tentativa de isolamento do virus circulante feita no 3.° dia, foi infrutifera. Camondongos brancos inoculados com o cerebro deste gato morreram paraliticos desde o 6.° dia. Com o cerebro do mesmo animal foi inoculado o gato 1660.

Gato 1660 — Inoculado a 19-2-38, por via cerebral, com 0 cc. 5 de emulsão de cerebro a 1:10, do gato 1653. A 23-2 estava paralitico, sendo franca a paralisia a 25-2, quando foi sacrificado. O cerebro inoculado na mesma data matou do 4.° ao 5.° dia os camondongos inoculados. A tentativa de isolamento do virus circulante praticada no 3.° dia da inoculação deu resultado negativo.

Gato 1668 — Gato adulto inoculado a 25-2-38, por via cerebral, com 0 cc. 5 de emulsão de cerebro do gato 1660. Não apresentou sintomas de infecção até 28-3. Tentativas de isolamento do virus circulante feitas no 7.°, 18.° e 26.° dias foram negativas.

Gato 1685 — Inoculado a 25-3-38, por via cerebral, com 0 cc. 5 de emulsão de cerebro de camondongos. A 31-3-38 apresentava perda da atividade e anorexia, tendo amanhecido morto a 1.°-4, não mais sendo recuperado o virus ao ser o cerebro inoculado em camondongos.

Gato 1684 — Inoculado a 25-3-38 com 0 cc. 5 de emulsão de cerebro de camondongos infetados. Amanheceu paralitico a 1.°-4-38, tendo sido sacrificado e sangrado, não tendo sido conseguido reisolar virus, quer do sangue, quer do cerebro deste animal. A temperatura desceu de 39° a 39°3 no 1.° e 2.° dias, para 38°2, 35°3 e 35°5.

Gato 1602 — Inoculado a 6-12-37 com 2 ccs. de diluição a 1:40 de virus Asibi, por via peritoneal, não apresentou sintoma algum até o dia 18-2 quando amanheceu morto. A tentativa de isolamento do virus circulante feita no 4.° dia

foi negativa. A inoculação do cerebro deste animal em camondongos não permitiu isolamento do virus.

Gato 1603 — Inoculado a 6-12 com 2 ccs. da diluição a 1:40 de virus Asibi, por via peritoneal. Não apresentou sintomas, morrendo, porém, a 23-2. Do sangue, retirado no 4.º dia, não foi conseguido reisolamento do virus.

Gato 1680 — Inoculado a 25-3-38, por via peritoneal, com 2 ccs. da diluição a 1:20 do virus Asibi, não apresentou sintomas, nem elevação termica, sendo infrutiferas as tentativas de reisolamento do virus praticadas no 6.º e no 12.º dias.

Gato 1681 — Inoculado a 25-3-38, por via peritoneal, com 3 ccs. da diluição a 1:20 de virus Asibi, não apresentou sintomas de infecção, nem elevação termica, tendo sido negativas as tentativas de reisolamento do virus feitas no 3.º e no 7.º dias de inoculação.

Gato 1082 — Inoculado a 25-3-38, por via sub-cutanea, com 2 ccs. de diluição a 1:20 de virus Asibi, não apresentou sintomas de infecção, nem elevação de temperatura, sendo infrutiferas as tentativas de reisolamento de virus feitas nos 3.º, 7.º e 17.º dias.

Gato 1683 — Inoculado a 25-3-38, por via intra-cardiaca, com 1 cc. da diluição a 1:20 do virus Asibi. Não apresentou sintomas, nem elevação termica, tendo sido negativas as tentativas de reisolamento do virus circulante praticadas no 3.º, 7.º e 17.º dias a partir da data da inoculação.

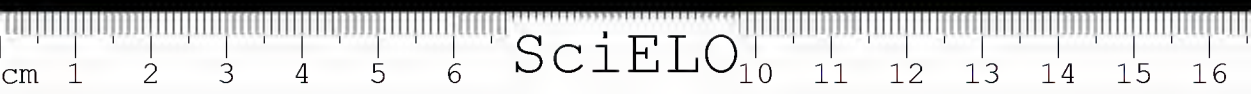
Gato 1738 — Inoculado a 19-5-1938 com 4 ccs. de sangue de *rhesus* por via peritoneal. Sangrado a 23-5 não foi conseguido isolamento do virus circulante. Amanheceu morto a 27-5-38; o cerebro inoculado em camondongos matou-os do 4.º ao 12.º dia, sem sintomas tipicos.

Gato 1739 — Inoculado a 19-5-38 com 5 ccs. de sangue de *rhesus* por via peritoneal. Sangrado a 23 a 27-5 e a 27-6 não foi conseguido reisolamento do virus. Amanheceu paretico a 13-6-38 e moribundo no dia seguinte, sendo feitas passagens do cerebro e figado a 14-6, não tendo sido obtido isolamento do virus.

CONCLUSÕES

1.ª) Gatos jovens são sensiveis à inoculação intra-cerebral do virus amarilico neurotropico na diluição de 1:20, morrendo com sintomas de encefalite.

2.ª) A passagem do virus neurotropico de gato para um gato jovem deu resultado positivo, sendo, porém, negativa a passagem para gato adulto.

3.ª) Do sangue dos gatos inoculados com virus neurotropico por via cerebral não foi possivel reisolar virus a partir do 3.º dia até o 20.º.

4.ª) Dois gatos jovens inoculados com diluição a 1:40 e dois com diluição a 1:20 do virus Asibi, todos por via peritoneal, não apresentaram sintomas de infecção, o mesmo insucesso sendo verificado com sangue de *rhesus* em natureza.

5.ª) Não foi conseguido isolamento de virus circulante de gatos inoculados com virus Asibi, diluido a 1:20 e 1:40, por via peritoneal, a partir do 3.º dia da inoculação.

6.ª) A inoculação de 2 gatos jovens pelas vias intra-cardiaca e sub-cutanea com virus Asibi diluido a 1:20 foi negativa, não tendo sido, outrosim, conseguido reisolamento do virus circulante a partir do 3.º dia.

7.ª) Tais verificações somadas às de Monteiro, Findlay e Nicolau e Baffet parecem demonstrar grande variação no comportamento dos gatos em relação à sensibilidade aos virus Asibi e neurotropico.

(Trabalho da Secção de Parasitologia e Protozoologia do Instituto Butantan. Dado à publicidade em Junho de 1939).

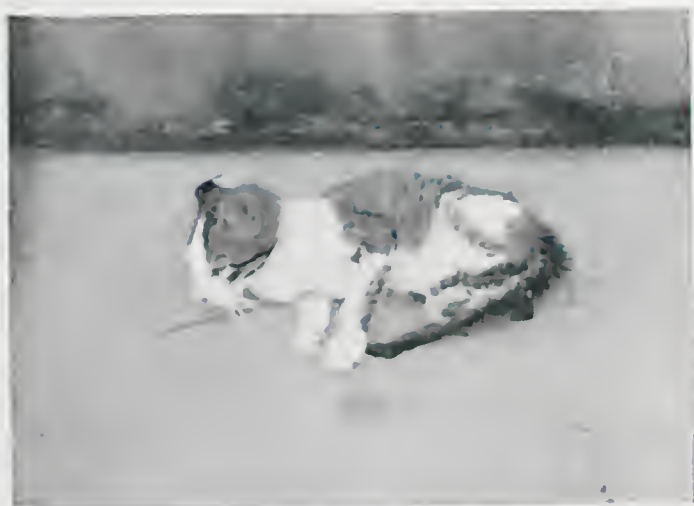



Fig. 1

Gato com paralisia do trem posterior, consequente à inoculação de virus amarilico neurotropico.

SENSIBILITÉ DU CHAT AU VIRUS AMARIL NEUROTROPE (*)

PAR

FLAVIO DA FONSECA ET PAULO ARTIGAS

La sensibilité des chats au virus amaril fut étudiée en 1930 par notre regretté collègue Lemos Monteiro (1). Dans ses recherches, qui avaient comme but la vérification de la possibilité d'existence d'un reservoir du virus de la fièvre jaune, il est parvenu à démontrer une certaine sensibilité de ce félidé, puisque l'inoculation par voie péritonéale de 2 cc. de sang de *rhesus* infecté avec du virus Asibi a permis d'observer de l'hyperthermie et le pouvoir infectieux du sang du chat au 12ème jour; le sang était encore immunisant au 30ème jour. Un autre chat, inoculé par Monteiro, bien que n'ayant pas présenté de symptômes avait d'anticorps immunisants dans le sang dès le 4ème jour et jusqu'au 30ème jour.

L'inoculation cérébrale de sang de *rhesus* pratiquée par Monteiro ne parvint pas à donner une infection typique au chat.

Aux resultats positifs signalés par Monteiro s'opposent les recherches négatives de Findlay (2) et de Nicolau et Baffet (3), qui ont expérimenté avec du virus neurotrope inoculé à de jeunes chats par voie cérébrale. Même des lésions histopathologiques semblabes à celles rencontrés chez le chien inoculé avec le même materiel n'ont pas pu être rencontrées chez le chat par ces auteurs.

Il est facile de comprendre que Monteiro n'ait pas obtenu l'infection en utilisant du virus Asibi introduit par voie cérébrale à cause de la moindre affinité de l'Asibi pour la substance nerveuse; mais il est surprenant que le virus neurotropé lui-même ne parvienne pas à infecter un animal dont la sensibilité à l'Asibi introduit par voie peritonéale avait dejà eté demontrée. En effet, nos recherches sur la sensibilité de nombreuses espèces d'animaux (4) nous avaient conduits à la conclusion que l'infection par le virus neurotrope était de beaucoup plus facile à obtenir que l'infection par le virus pantrope et la littérature sur le sujet nous apprend qu'il n'y a pas d'animal, pour peu qu'il soit sensible au

(*) Travail réalisé à l'Institut Butantan avec la collaboration du Service Especial de Défense contre la Fièvre Jaune de l'État de S. Paulo.

virus Asibi, qui ne le soit pas aussi au virus neurotrope inoculé par voie cérébrale. On était donc autorisé à supposer, d'après les résultats de Findlay et de Nicolau et Baffet, qui seule l'existence de races de chats insensibles au virus amaril pouvait expliquer ces divergences, une faute d'observation ou de technique pouvant être exclué, etant donnée la compétence indiscutable des auteurs et que les observations avaient été faites independamment.

En vue d'élucider la question nous avons entrepris des recherches utilisant le virus neurotrope de la souche française et le virus Asibi, conservés d'après les techniques cités dans d'autres travaux. Les felidés inoculés n'apartenaient à aucune race déterminée, leur provenance ayant toujours été ha ville de S. Paulo. On n'a utilisé que des animaux jeunes, d'á peu près deux ou trois mois, excepté dans un cas ou un animal adulte fut aussi inoculé.

Chat 1653 — Inoculé de 11-II-1938 avec 0c.c.1 d'émulsion à 1:20 de cerveau de souris paralytiques, par voie cérébrale. Au cours des quatres premiers jours la température a oscillé entre 36°3 et 36°7, tombant à 35° et une fraction aux jours suivants. Une tentative d'isolement de virus circulant faite au 3ème jour est restée sans succès. Le 19-II l'animal présenta de la paralysie de l'arrière train (Fig. 1) et fut sacrifié. Des souris inoculées avec du cerveau moururent en paralysie dès le 6ème jour, un passage de chat à chat ayant eté avec l'animal suivant, No. 1660.

Chat 1660 — Inoculé dans le cerveau le 19-II-1938 avec 0c.c.5 de cerveau du chat 1653 dilué au dixième. De la parérie fut observée dès le 23-II, suivie d'une franche paralysie le 25-II, quand l'animal fut sacrifié. L'inoculation du cerveau à des souris blanches les tua du 4ème au 5ème jour. La recherche de virus circulant, pratiquée le 3ème jour a donné des resultats négatifs.

Chat 1668 — Adulte inoculé le 25-II-38 par voie cérébrale avec 0c.c.5 d'émulsion de cerveau du chat 1660. Il n'a pas présenté des symptômes pendant 33 jours d'observation. Les recherches de virus circulant faites au 7ème, 18ème at 26ème jours furent négatives.

Chat 1685 — Inoculé au cerveau le 25-III avec 0c.c.5 de cerveau de souris paralytiques. Le 31-III il présenta de l'anorexie, une activité diminuée et mourut pendant la nuit; le virus ne put être reisolé par l'inoculation du cerveau à des souris.

Chat 1684 — Inoculé le 25-III-38 avec 0c.c.5 d'emulsion de cerveau de souris infectées. La temperature de 49° et 39°3 le premier et le second jours tomba a 38°2, 35°3 et 35°5. L'animal présenta de la paralysie le 1er IV quand il fut sacrifié. Les tentatives de réisolement du virus avec du sang et avec du cerveau ont été négatives.

Avec du virus Asibi desséché dans le vide ou avec du sang de *rhesus* en nature furent inoculés sans succès 6 jeunes chats par voie péritonéale, un par voie souscutanée et un par voie intracardiaque.

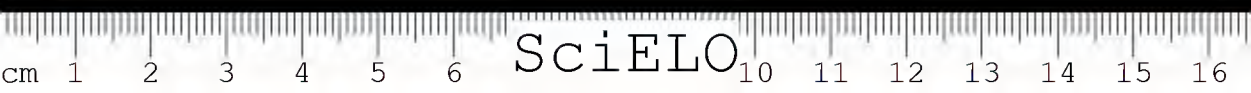
RESUMÉ

L'inoculation de virus, amaril neurotrope dans le cerveau du chat confère une paralysie tipique, un passage du virus de chat à chat pouvant être obtenu, pourvu qu'on utilise d'animaux jeunes. La circulation du virus neurotrope inoculé par voie cerebrale ne put pas être constatée même au 3ème jour. Des jeunes chats inoculés par les voies péritonéale, souscutanée ou cardiaque avec du virus Asibi n'ont pas présenté des symptômes nets d'infection. Ces verifications jointes à celles de Monteiro, de Findlay et de Nicolau et Baffet, semblent démontrer une grande variation dans le comportement des chats aussi bien à l'égard de l'inoculation avec du virus neurotrope qu'avec le virus Asibi.

BIBLIOGRAFIA

(1) *Monteiro, J. L.* — Brasil Medico **44**:1087.1930.
(2) *Findlay, G. M.* — Jl. of Path. and Bact. **38**(1) :1.1934.
(3) *Nicolau, S. & Baffet, O.* — Bull. Soc. Path. Exot. **8**:611.1937.
(4) *Fonseca, F. da & Artigas, P.* — Compt. Rd. Soc. Biol. **129**(34) :1134.1938 *et* Memorias do Instituto Butantan **12**:229.1938-39.

(Trabalho da Secção de Parasitologia e Protozoologia do Instituto Butantan. Dado à publicidade, em resumo, in C. R. Soc. Biol. 129(34).1938).

616.928

PESQUISAS SOBRE O COMPORTAMENTO DE ANIMAIS SILVESTRES INOCULADOS COM VIRUS AMARILICO (*)

POR

FLAVIO DA FONSECA & PAULO ARTIGAS

Desde que ficou estabelecida a noção da sensibilidade de *Macaca mulatta mulatta* (= *Macacus rhesus* = *Silenus rhesus*) (1) ao virus amarilico, esforçaram-se os pesquisadores por encontrar outras especies de primatas que demonstrassem igual receptividade, iniciando-se uma serie de investigações sobre a infecção experimental de macacos que ainda hoje prossegue.

Em 1930 o nosso malogrado companheiro de trabalho Lemos Monteiro (2) teve, pela primeira vez, a idéa, talvez então julgada por demais avançada, de pesquisar a sensibilidade de cães e gatos ao virus amarilico, tendo demonstrado a persistencia de virus circulante no organismo desses mamiferos domesticos.

Com o advento das novas noções sobre a epidemiologia da febre amarela, comprovada a possibilidade de se manifestar a infecção com modalidade extra-urbana, tornou-se do mais alto interesse a pesquisa da sensibilidade de animais silvestres ao virus amarilico, pois a descoberta de um ou mais que pudessem funcionar como reservatorios naturais viria não somente simplificar a compreensão do modo pelo qual se entretem o virus na natureza, como tambem, talvez, auxiliar eficazmente as medidas profilaticas a serem aconselhadas.

Pesquisa de realização aparentemente facil, oferece na pratica um sem numero de dificuldades, desde que se a deseje realizar em maior escala. A obtenção de animais silvestres vivos e de boa saúde, de proveniencia perfeitamente conhecida, em numero suficiente e em prazo curto depende de um serviço de capturas

---

(*) Os trabalhos em questão foram realizados no Instituto Butantan em virtude de acordo entre esta instituição e o extinto Serviço Especial de Defesa contra a Febre Amarela, a cujo diretor, dr. Henrique Aragão, deixamos consignados agradecimentos pelo auxilio concedido para a realização das presentes pesquisas. Somos tambem gratos a T. C. S. Morrison-Scott, do Museu Britanico, que levou a efeito a determinação de varios exemplares de *Muridae*, *Felidae* e *Canidae*.

bem organizado, funcionando com regularidade perfeita e, a menos que se disponha de numerario à discreção, deverá ser organizado pelo proprio laboratorio interessado, que regulará os fornecimentos e determinará a proveniencia do material.

A raridade de informes registados na literatura sobre o momentoso problema repousa certamente nesta dificuldade que oferecem as capturas. Abstraidas as pesquisas sobre a sensibilidade de simios, iniciadas logo após as verificações de Stockes, Bauer e Hudson, por Aragão, em 1928 (3), só se encontram referencias esparsas sobre a sensibilidade desta ou daquela especie animal, não havendo na literatura um só trabalho de maior vulto, em que seja feito um inquérito, ainda que parcial, sobre o comportamento da fauna de uma dada região.

Mesmo assim são valiosas as pesquisas isoladas até agora realizadas, as quais permitiram já a descoberta de animal ainda mais sensivel do que o *rhesus*, o ouriço europeu, *Erinaceus europeus*, segundo as pesquisas de Findlay e colaboradores (4).

Encarregados de efetuar pesquisas sobre a sensibilidade de animais silvestres pela diretoria do extinto Serviço Especial de Defesa contra a Febre Amarela que controlava as pesquisas sobre a febre amarela no Estado de São Paulo, tratámos de conjugar os esforços do serviço de capturas de animais silvestres que mantem a nossa Secção de Parasitologia no Instituto Butantan, com o serviço de fornecimento de animais entretido pelo mesmo Instituto no interior do país e com o auxilio do que nos poude prestar o S.E.D.C.F.A.. Dessa associação resultou um fornecimento de mamiferos que, sem ser o ideal, possibilitou, entretanto, a obtenção de resultados interessantes para a fauna da região neotropica.

Revista a bibliografia pertinente ao assunto e postas de lado as verificações sobre a sensibilidade de primatas, referidas em outro trabalho, encontram-se na literatura dados sobre o comportamento das seguintes especies animais, apresentados pela ordem cronologica das observações.

Canis familiaris. — Segundo as verificações de Lemos Monteiro (2), a inoculação subcutanea de sangue e figado de *rhesus* infetado com virus Asibi em cão permite o encontro de virus circulante atenuado até 12 dias após a inoculação, não sendo, porém, o cão sensivel á infecção. Nicolau e Baffet (5), inoculando por via cerebral virus neurotropico não obtiveram infecção, verificando, porém, que, apesar do cerebro não ser infetante 8 a 19 dias após a inoculação, se observam, todavia, lesões de encefalite e inclusões nucleares.

Felis catus. — Na mesma serie de experiencias realizadas em 1930 no Instituto Butantan, relatou Lemos Monteiro (2) poderem gatos adultos inoculados pelas vias peritoneal ou subcutanea com sangue de *rhesus* infetado com virus Asibi apresentar reação febril, abatimento e paresia fugaz. *Rhesus* inoculados com sangue destes animais, datando até de 30 dias, não apresentaram infecção

mostrando-se, porém, imunizados ao lhes ser feita inoculação de material seguramente ativo. Virus Asibi inoculado por via cerebral (0 cc. 5 de sangue de *rhesus*) não provocou infecção, tendo, porém, sido obtida paralisia passageira após inoculação de virus amarilico neurotropico (? 3.ª passagem por camondongo) por via peritoneal.

Nicolau e Baffet (5), inoculando virus neurotropico por via cerebral em gatos jovens, não só não obtiveram sintomas de infecção, como tambem não observaram lesões histo-patologicas semelhantes às encontradas nos cães, concluindo parecerem os gatos ser completamente refratarios, resultado este ao qual se opõe o dos autores da presente nota, referido em outra publicação (34).

Cavia porcellus. — Não levado em consideração o trabalho de Kuczinski e Hohenadel (7), em que é alegado haver sido obtida infecção amarilica (!) da cobaia ora com material de rhesus, ora após inoculação de uma mistura de tres culturas do difteroide *B. hepatodysdrophicans*, considerado então por Kuczinski o agente da febre amarela, a primeira verificação da persistencia do virus amarilico no organismo da cobaia cabe a Sellards (8), que conseguiu reisolar virus de cobaia inoculada com material de *rhesus* infectado. Dinger, Schüffner e Snijders (9) obtiveram resultados semelhantes, bem como Sawyer e Frobischer (10). A primeira verificação de produção de encefalite, porém, cabe a Theiler (11), que conseguiu a transmissão em serie, partindo do virus neurotropico da amostra francêsa com 158 passagens em camondongo, fato este logo a seguir confirmado por Stephanopoulo e Wassermann (12).

Lloyd, Penna e Mahaffy (13) obtiveram encefalite em cabaias, estudando a distribuição do virus, que alcança o sistema nervoso periferico, e a patologia das lesões. Stephanopoulo (14) assinala a sensibilidade da cobaia à introdução do virus por via intraraqueana e mesmo, excepcionalmente, à via intraperitoneal, com produção de encefalite em ambos os casos. Nicolau, Mathis e Baffet (15) referem o alargamento do periodo da incubação e a diminuição da virulencia após 35 passagens em serie em cobaia. Sob o ponto de vista anatomo-patologico foram tais lesões estudadas em cobaias e outros animais por Findlay e Stern (16). Findlay (17) verificou a presença do virus no sistema nervoso central e nas capsulas suprarenais de cobaias inoculadas com virus neurotropico por via cerebral. Nicolau, Kopciowska, Mathis e Baffet (18) fizeram estudo anatomo-patologico antes de Findlay e Stern. Cowdry e Kitchen (19) não encontraram inclusões nucleares em cobaias inoculadas por via cerebral.

Molossus obscurus e *Desmodus rufus.* — Kumm (6) baseado no fato de se alimentarem facilmente os *Aedes aegypti* em morcegos, experimentou a sensibilidade destas duas especies ao virus Asibi por picada de *Aedes aegypti* infectados, verificando não serem êles sensiveis. Obteve, entretanto, transmissão mecanica do virus de *rhesus* infectados para sãos durante a picada de *Desmodus*

rotundus, desde que o intervalo entre as duas picadas não ultrapassasse 2 minutos.

Dasyprocta aguti. — Lloyd e Penna (20) e Lloyd, Penna e Mahaffy (12) demonstraram ser a cotia sensivel à inoculação intracerebral do virus neurotropico.

Microtus agrestis. — A infecção deste roedor foi obtida com virus neurotropico por Findlay (21) que obteve 80 % de encefalite.

Mus musculus musculus, Mus musculus gentilis e *Mus musculus azoricus* — A primeira destas especies, o camondongo cosmopolita domestico foi verificada sensivel à inoculação do virus neurotropico por via cerebral, mas não pela intraperitoneal por Laigret (22), assinalando tambem Stephanopoulo a sua sensibilidade (13). As duas outras sub-especies, ambas africanas, foram experimentadas por Laigret (22), que observou ser a primeira sensivel à inoculação cerebral e a ultima tambem à inoculação intraperitoneal de virus presumivelmente neurotropico, pois em seu trabalho não é declarado taxativamente qual o virus utilizado, salvo para *M. m. musculus*.

Sus scrofa. — Stephanopoulo, Mollaret e Desnos (23) observaram febre, paralisia e morte no 7.º dia consecutiva à encefalo-mielite em um leitão inoculado por via cerebral com virus neurotropico, não tendo, porém, o cerebro e o liquido cefalo-raqueano se mostrado infetantes para camondongos e macacos. Obtiveram provas da proteção positiva no 28º dia com o sôro e o liquido cefalo-raqueano de um segundo leitão inoculado por tres vezes com virus pantropico e uma vez com virus neurotropico.

Sciurus vulgaris. — Findlay (21) obteve encefalite neste esquilo após inoculação do virus neurotropico.

Erinaceus europeus. — Findlay em 1934 (24) verificou a alta sensibilidade deste *Insectivora* europeu ao virus neurotropico, cuja inoculação intracerebral provoca necrose do figado. Posteriormente (25) Findlay e Clarke observaram a grande sensibilidade do mesmo animal ao virus pantropico, tendo morrido 100 % de 28 inoculados do 4.º ao 70.º dia. Subsequentemente verificaram os mesmos pesquisadores (26) que a sensibilidade do *Erinaceus europeus* é tal que a propria inoculação do virus neurotropico praticada por via intraperitoneal ou subcutanea tem sempre decurso fatal, aparecendo os sintomas do 6º ao 11º dia. Ao contrario dos restantes animais sensiveis, o virus persiste após a morte no cerebro, figado, rins, baço e suprarenais, embora só raramente exista no sangue.

Estas verificações apresentam um interesse consideravel, pois sendo a sensibilidade de *Erinaceus europeus* maior do que a do proprio *rhesus*, possibilita o emprego desse animal como reativo para verificação do grao de atividade do virus utilizado na vacinação humana (27), como bem o assinala Thiroux (28) conferindo maior segurança ao seu emprego.

Atelerix albiventris (= *Erinaceus pruneri*). — A sensibilidade do ouriço sudanês foi verificada por Findlay, Hewer e Clarke (29), que observaram infecção após inoculação com virus Asibi.

Cytilus cytilus. — Stephanopoulo, Nagano e Wassermann (30) comunicaram ter verificado que o cerebro do espermofilo inoculado com virus neurotropico por via cerebral era infetante no 5º dia, sendo, todavia, negativa a inoculação intraperitoneal e a intracerebral com virus Asibi e com virus adaptado à cobaia. Só foi conseguida a primeira passagem em serie.

Rana catesbiana. — E' a unica citação da obtenção de virus de animal de sangue frio inoculado; foi conseguido do sangue por Sawyer e Frobischer (31) após 4 dias de inoculação do virus Asibi no coeloma.

Rato (*sp. ?*). — Citado por Findlay (21) como sensivel à inoculação intracerebral, sobrevivendo o virus seis dias.

Evotomys glareolus, *Apodemus sylvaticus* e o coelho não se mostram sensiveis segundo Findlay (21). Furão (*Putorius foetidus*), "hamster" dourado (*Cricetus auratus*), pombo, galinha e canario foram inoculados sem sucesso por via cerebral por Findlay (21), bem como *Rana temporaria*, inoculada por via cerebral e no saco linfatico por Stephanopoulo, Nagano e Wassermann (30), o mesmo sucedendo no coelho domestico, segundo Whitman (32), o qual, aliás, dá prova da proteção positiva, sendo mesmo possivel a hiperimunização.

Pesquisas originais

Conhecidas as aquisições modernas sobre a sensibilidade de animais silvestres ou domesticos ao virus amarilico, passaremos a descrever as experiencias instituidas em nosso laboratorio no decurso dos anos de 1937 e 1938, deixando de parte, por constituirem objeto de outro trabalho, as que dizem respeito aos primatas.

Material

Os animais utilizados em nossas verificações provinham em grande parte das matas do Horto Florestal do Estado de S. Paulo, na Serra da Cantareira, cujo diretor, dr. José Cabral, nos concedeu, a titulo excepcional e à vista dos fins colimados, permissão para efetuar a captura de quaisquer especimes de fauna representada nessa importante reserva de caça. Para a captura desses exemplares contámos com a decisiva colaboração do dedicado auxiliar tecnico do Instituto Butantan, sr. José Navas, o qual de modo absolutamente desinteressado se prestou a executar, sob a nossa orientação, êsses penosos e muitas vezes arriscados trabalhos. Os restantes exemplares por nós utilizados, foram, em sua

maior parte, obtidos graças ao serviço de permuta entretido pela Secção de Parasitologia com os fornecedores de ofidios do Instituto Butantan. Em menor percentagem foram os animais em questão adquiridos de particulares graças ao auxilio do Serviço Especial de Defesa contra a Febre Amarela.

Os virus utilizados nas experiencias foram fornecidos pelo S.E.D.C.F.A., que os obteve da Fundação Rockefeller: virus pantropico Asibi (No. 40.087 + 4.061) e virus neurotropico (F. 654). O primeiro foi por nós conservado seco em alto vacuo após congelação pela neve carbonica, segundo a tecnica de Sawyer, Lloyd e Kitchen (33), tendo o segundo sido entretido quer por passagens sucessivas por camondongos brancos de estirpe Swiss, importados pelo S.E.D.C.F.A. da America do Norte e criados no Instituto Butantan, quer por secagem em alto vacuo após congelação.

De todos os animais utilizados foi, antes de injetá-los com virus, retirado sangue para inoculação em camondongos, visando a pesquisa do virus natural, verificação esta de resultados negativos em todos os animais examinados.

Suidae

Tajassus tajassu. — Cateto ou pecari — Foram utilizados apenas animais jovens, com alguns meses de idade, todos capturados em estado selvagem no Horto Florestal, na Serra da Cantareira, cidade de São Paulo.

Cateto 1630. — Inoculado por via cerebral com 0 cc. 5 de emulsão a 1 :20 de cerebro de camondongos moribundos, a 11.2.38. Sangrado a 14.2.38 não foi encontrado virus circulante. A temperatura foi de 39°1, 38°9, 40° e 38°7 do 1° ao 5° dia da inoculação. A 15.2 apresentava-se paretico e com contraturas. A 16.2 a paralisia era completa nos membros não se sustendo o animal de pé (Foto 1), sendo então sacrificado. Do figado inoculado em seis camondongos não foi possivel reisolar virus, nem tampouco do sangue. O cerebro, porém, inoculado em seis camondongos deu como resultado a morte de um e a paralisia de tres no 6° dia, morrendo tres no 7° dia, quando foram sacrificados os dois restantes para passagens, tendo sido feitas sete passagens sucessivas em camondongos com o virus reisolado.

Cateto 1634. — Inoculado a 16.2.38 com 1 cc. de emulsão do cerebro do cateto 1630 por via intracerebral, apresentou-se paretico a 25.2., firmando-se a paralisia a 26.2. (Foto 2), amanhecendo morto a 27.2.. A temperatura, que oscilára entre 38°7 e 39°1 nos sete primeiros dias subiu a 40°5 no oitavo dia e a 40°4 no nono dia. A pesquisa do virus circulante realizada a 23.2 foi negativa. Do cerebro foi reisolado virus em um lote de seis camondongos que morreram do 6° ao 7° dia, tendo sido feitas ao todo com este virus sete passagens de camondongo a camondongo.

Cateto 1633. — Irmão de um dos precedentes. Inoculado a 21.1.38 com 1 cc. de soluto 1 : 20 de virus Asibi por via subcutanea não apresentou sintoma

algum de molestia, não tendo sido conseguido o reisolamento do virus circulante no 5º, 10º nem no 17º dias. A temperatura, que foi de 39º8 no segundo dia da inoculação, baixou a 38º9 no terceiro dia, subindo a 39º8 no setimo dia, não indo além de 39º2 nos dias seguintes.

Caviidae

Cavia aperea ERXL. (*rufescens?*). — Com este pequeno *Caviidae* extremamente comum em todo o Brasil, foi feita uma experiencia levada a bom termo com animal proveniente de Pindamonhangaba, Estado de São Paulo:

Preá 1620. — Inoculada a 5.1.38 por via cerebral com 0 cc. 5 de emulsão a 1 : 20 de cerebro de camondongos paraliticos. A 8.1 foi sangrado, não tendo sido conseguido isolamento de virus circulante. Apresentou-se paralitica a 10.1.38, morrendo no dia seguinte. O cerebro deste animal inoculado em camondongos suissos matou todos do 4º ao 6º dia, tendo sido efetuadas mais doze passagens de camondongo a camondongo com este virus, cujo comportamento foi normal.

Da experiencia com a preá No. 1621, de Ribeirão Pires, Estado de São Paulo, inoculada por via cerebral, com virus neurotropico, não foi possivel chegar à conclusão por ter morrido acidentalmente poucos dias depois da inoculação. A preá ♂ 1598, inoculada a 1.11.37 com 2 ccs. de virus Asibi por via peritoneal não apresentou sintomas, morrendo a 6.12.37; o cerebro inoculado em camondongos não foi isolado virus. De ambas foi tentado o isolamento do virus circulante, no terceiro dia após a inoculação, com resultados negativos.

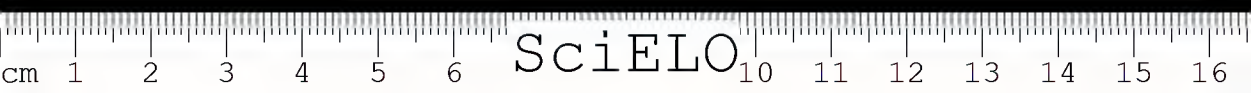
Hydrochoerus capybara. — No. 1690 inoculado a 5.4.38 com 5 ccs. da diluição a 1:10 de virus Asibi por via subcutanea; não foi conseguido o reisolamento do virus no 3º dia. A morte do animal durante a punção cardiaca praticada nesse dia não permitiu a continuação da observação.

Capivara 1735. — Inoculada a 12.5.38 com 1 cc. de virus neurotropico a 1 : 20 por via cerebral. Sangrada a 16.5.38, morreu na sangria, não tendo sido conseguido reisolamento do virus do sangue.

Capivara 1737. — Inoculada a 19.5.38 com 2.5 ccs. de sangue de *rhesus* (virus Asibi) por via peritoneal. Amanheceu com abatimento a 3.6, morrendo a 4.6. Camondongos inoculados com cerebro não apresentaram sintomas.

Capivara 1751. — Inoculada a 27.5.38 com 1 cc. 5 de emulsão a 1 : 20 de virus neurotropico apresentou temperatura maxima de 35º8. Amanheceu paralitica a 14.6.38 (Foto. 5), sendo sacrificada, não tendo sido conseguido reisolamento do virus.

Didelphyidae

Didelphys aurita. — Foram realizadas experiencias com nove animais, dos quais tres machos, só em dois casos tendo sido positiva a inoculação.

Gambá 1615 ♀. — Proveniente de Cerqueira Cesar, Estado de São Paulo Inoculada a 5.1.38 com 0 cc. 5 de emulsão a 1 : 20 de virus neurotropico por via cerebral. Sangrado no 3º e 8º dias após a inoculação, não foi verificada existencia de virus circulante. A temperatura oscilou entre 35º6 e 36º8 até o 5º dia, subindo a 39º2 no 7.º, tendo morrido o animal no 8.º dia. A inoculação do cerebro deste animal em camondongos matou-os com encefalite no 7º dia. Com o virus assim reisolado foram efetuadas mais 22 passagens em camondongos, comportando-se normalmente o virus.

Uma outra gambá, No. 1628, da Serra da Cantareira, São Paulo, inoculada a 11.2.38 com 0 cc. 2 de emulsão de virus neurotropico por via cerebral, não apresentou sintomas, tendo morrido a 22.2. Outras verificações não foram instituidas, não ocorrendo elevação termica nas vesperas da morte (temperatura maxima observada 35º7).

Gambá 1629 ♂. — Proveniente da Serra do Mar, São Paulo. Inoculada a 21.1.38 com 1 cc. 5 de diluição a 1 : 20 do virus Asibi por via subcutanea. Não teve outro sintoma além da elevação termica a 37º no 6º dia, o que é excepcional em didelfideos, cuja temperatura media é de 35º. A tentativa de isolamento do virus circulante a 26.1 foi infrutifera. Como amanhecesse morta a 30.1, foi o cerebro inoculado em camondongos, conseguindo-se isolamento do virus, com o qual foram feitas cinco passagens em camondongos, parecendo o virus estar, inicialmente, bastante atenuado.

Quatro outros exemplares foram inoculados por via subcutanea com diluição a 1 : 20 e 1 : 40 de virus Asibi seco (Nos. 1530 e 1627 ♂ ♂ e 1580, 1661 ♀ ♀) com resultados negativos, quer quanto à infecção, quer quanto ao isolamento do virus circulante, tentado no 3º e no 8º dias após a inoculação. Do 1627, inoculado com o mesmo material e no mesmo dia que o 1629, foi tentado sem resultado o isolamento do virus do cerebro no 28º dia.

Tambem foi negativa a tentativa de infecção com virus Asibi a 1 :20 e 1 :40, injetado por via peritoneal, em duas gambás ♀ ♀ (Nos. 1612 e 1675), na dose de 2 ccs.. Tambem neste caso foi infrutifera a tentativa de isolamento do virus circulante já no 3º dia.

Um outro exemplar (No. 1715) foi inoculado a 27.4.38 com solução a 1 : 10 de virus Asibi nos dois testiculos (0 cc. 25 em cada um), não tendo sido conseguido reisolamento do virus quer circulante, tentado a 30.4 e 4.5, quer dos testiculos, ao ser sacrificado a 11.5.38.

Didelphys paraguayensis. — Desta especie foram experimentados quatro animais, dos quais tres (Nos. 1284 e 1671 ♂ ♂ e 1672 ♀) injetados com 1 cc. de diluição a 1 : 20 ou 1 : 40 do virus Asibi, por via subcutanea e um (No. 1674 ♂) com 0 cc. 5 de virus neurotropico por via cerebral. Estas inoculações foram negativas nos quatro animais, não tendo tambem dado resultado as tentativas de isolamento do virus circulante feitas no 3º e no 8º dias de inoculação

Marmosa spp.. — Foram inoculados tres animais pertencentes a especies diferentes, todos com 1 cc. de virus Asibi em diluição a 1 :40, por via subcutanea. Apenas o de No. 1576 ♂ apresentou sintomas suspeitos, como paralisia do trem posterior no 15º dia. Sacrificado, porém, e inoculado o sangue, cerebro e figado em camondongos, não foi reisolado o virus.

Nasua narica (Coati). — Foram inoculados dois exemplares.

Coati 1679. — Inoculado a 25.3.38 com 0 cc. 5 de emulsão a 1 :20 do virus neurotropico por via cerebral. As tentativas de reisolamento do virus circulante foram frustadas por se ter o sangue mostrado altamente toxico ao ser inoculado em camondongos por via cerebral, matando 70 a 80 % dos animais no mesmo dia da inoculação. A 3.4 manifestou-se inicio de paralisia, que se tornou completa no dia seguinte, quando o animal foi fotografado (Foto. 3) e sacrificado. O cerebro inoculado em camondongos matou a todos com paralisia tipica do 6º ao 7º dias, tendo sido ainda realizadas mais quatro passagens com o virus assim reisolado, comportando-se êle normalmente. A temperatura deste animal elevou-se a 40º5 e 40º4 no 5º e 6º dias, baixando em seguida até 39º1 na vespera de ser sacrificado.

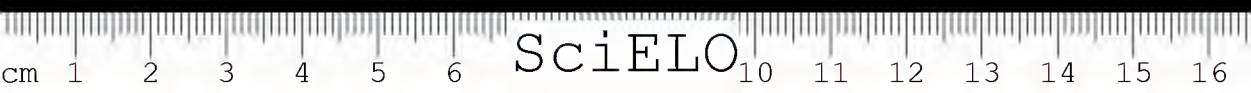
Outro exemplar (No. 1666), capturado pelo nosso Serviço na Serra da Cantareira, em São Paulo, inoculado por via subcutanea com 2 ccs. de soluto a 1 :20 de virus Asibi, não apresentou sintomas, oscilando a temperatura entre 37º e 38º7. A tentativa de isolamento do virus circulante, feita no 8º dia foi infrutifera.

Trahira barbara (Irára). — Foram inoculados dois animais ainda jovens provenientes de Coronel Macedo, Estado de São Paulo.

Irára 1610 ♂. — Inoculada a 22-12-37 por via subcutanea com 2 ccs. de soluto a 1 :40 de virus Asibi, não apresentou sintomas de infecção, tendo a temperatura oscilado entre 39 e 40º4 durante os vinte dias em que foi tomada. A tentativa de isolamento de virus circulante não poude ser levada a efeito, por matar o sangue deste animal todos os camondongos com êle inoculados dentro de curto prazo.

Irára 1609 ♀. — Inoculada a 5.1.38 com 0 cc. 5 de emulsão a 1 :20 de virus neurotropico por via cerebral. Apresentou inicio de paralisia a 10.1, sendo sacrificada a 14.1.38. A tentativa de reisolamento do virus foi dificultada por se terem mostrado toxicos não só o sangue como tambem o cerebro deste animal, quando inoculados em camondongos.

Dasypodidae. — Tres especies tiveram a sensibilidade pesquisada, num total de 12 animais.

Cabassous unicinctus. — "Tatú de rabo mole", No. 1637. Capturado na Serra da Cantareira, em São Paulo. Inoculado a 21.1.38 com 1 cc. 5 de virus

Asibi na diluição de 1 :20 por via subcutanea. A 26.1 foi sangrado, sendo inoculados tres camondongos por via cerebral, dos quais um se apresentou moribundo, sendo sacrificado para passagem no dia 6.2.. Um outro dos camondongos inoculados com sangue do tatú a 26.1 adoeceu a 10.2, morrendo a 12.2; o restante não teve sintomas de infecção. Com o cerebro do camondongo sacrificado a 6.2 foram inoculados seis novos camondongos que morreram do 8º ao 10º dia com encefalite. Com o virus circulante assim reisolado foram feitas mais onze passagens. A 31.1 foi o tatú novamente sangrado não mais sendo conseguido reisolar virus circulante, o mesmo acontecendo a 7.2. O tatú não apresentou sintomas de infecção por virus, vindo a morrer muito mais tarde de infecção intercorrente.

Dasypus novemcinctus. — Tatú 1709 ♂. proveniente da Serra do Mar, São Paulo. Inoculado a 22.4.38 com 0 cc. 5 de virus neurotropico a 1 :20 por via cerebral. Apresentou inicio de paralisia a 2.5.38, amanhecendo moribundo a 4.5, quando foi sacrificado, havendo a necropsia demonstrado supuração encefalica. A temperatura maxima apresentada foi de 35º5 no 5º dia.

Tatú 1710 ♀. — Da mesma proveniencia que o anterior. Inoculado com o mesmo material, na mesma data e pela mesma via, amanheceu com contraturas e paralisia completa das patas posteriores a 28.4.38, tendo sido sacrificado nesta data, fazendo-se passagens de sangue, cerebro e figado, cujos resultados foram negativos. A temperatura deste animal nunca chegou a atingir 35º.

Tatú 1700, 1701 e 1712 ♂ ♂. — Provenientes da Serra do Mar. São Paulo. Inoculados os dois primeiros a 18.4.38 com 2 ccs. 5 e o segundo a 25.4 com 2 ccs. de diluição a 1 : 10 do virus Asibi por via subcutanea. Foram negativas tanto a inoculação quanto as tentativas de isolamento do virus circulante.

Tatú 1713 ♂. — Inoculado a 25.4.38 com 2 ccs. de diluição a 1 : 10 de virus Asibi por via peritoneal. A pesquisa do virus circulante feita a 29.4 e a 2.5 foi negativa. Sacrificado a 2.5 foi inoculado material de figado e cerebro em camondongos, não tendo sido conseguido isolamento do virus. A temperatura maxima apresentada foi de 35º5.

Tatú 1744. — Inoculado a 24.5.38 com 1 cc. de virus neurotropico a 1 : 20 por via cerebral. Sangrado a 27.5.38 não foi conseguido reisolamento do virus. A 2.6.38 apresentou inicio de paralisia, amanhecendo moribundo a 3.6, quando foi sacrificado. Sangue, figado e cerebro foram inoculados em comondongos, sendo reisolado virus do cerebro e feitas passagens.

Tatú 1752. — Inoculado a 30.5.38 com 5 ccs. de virus Asibi seco diluido a 1 :10 por via peritoneal. Sangrado a 1.6 e a 6.6.38. Sacrificado por estar moribundo a 11.6, sendo feitas passagens de cerebro e sangue, sendo inoculado com cerebro o tatú 1753. Foi isolado virus circulante a 1º.6, com ele sendo feitas quatro passagens em camondongo.

Tatú 1753. — Inoculado a 11.6.38 com emulsão do cerebro do tatú 1752 por via peritoneal. Amanheceu morto a 17-6, não tendo sido realizadas outras pesquisas.

Euphractes sexcinctus

Tatú No. 1649 ♂. — Inoculado a 3.2.38 com emulsão de cerebro de camondogos paraliticos, por via subcutanea, nada apresentou de anormal, sendo infrutifera a tentativa feita no 15° dia para isolar virus circulante, tendo as dos 3° e 5° dias falhado por se mostrar o sangue toxico para camondongos.

Tatú 1711 ♂. — Inoculado a 25.4.38 com virus Asibi nos testiculos não apresentou sintomas de infecção, não tendo sido levadas a efeito outras pesquisas

Grupos experimentados com resultados negativos

Coendidae

Coendu prehensilis. — Dois ouriços desta especie (Nos. 1534 e 1536) foram inoculados por via peritoneal a 6.10.37 com emulsão de figado de *rhesus* com febre amarela (virus Asibi), conservado dois dias a -15°. Não apresentaram sintomas de molestia, sendo negativa a pesquisa do virus circulante no 3°, 8° e 28° dias. A inoculação do figado e cerebro do ouriço No. 1536, morto a 9.11 em camondongos não permitiu o isolamento do virus.

Um outro ouriço da mesma especie inoculado a 1.12.37 com virus Asibi seco, na dose de 2 ccs. da diluição a 1:40, não apresentou sintomas de infecção, tendo sido infrutifera a tentativa de isolamento do virus circulante feita a 3.12. As inoculações de camondongos feitas a 17.12.37 com figado, cerebro e baço deste ouriço, morto espontaneamente nessa data, foram prejudicadas por estar o material contaminado.

Muridae

Nectomys squamipes Brants. — Desta grande ratazana das matas foram inoculados tres exemplares (♂♂ 1541 e 1551 e ♀ 1552), todos com 1 cc. de diluição a 1:40 de virus Asibi por via subcutanea, não tendo havido reação febril ou outros sintomas dentro dos dois meses em que se prolongou a observação em dois deles e um mês em outro (1551).

Mus musculus musculus. — Do camondongo domestico foram inoculados onze exemplares (lotes 111, 112 e 261), todos por via cerebral, com emulsão a 1:20 de cerebro de camondongos suissos moribundos na dose de 0 cc. 03. Nenhum deles apresentou sintomas de infecção.

Rattus norvegicus. — Desta ratazana foi inoculado 1 exemplar (lote 470) com virus neurotropico, não tendo apresentado sintomas.

Muridae sp. — Sete exemplares pertencentes a duas especies diferentes, ainda não identificadas, inoculadas por via cerebral, quatro com 0 cc. 3 e tres com 0 cc. 1 de virus neurotropico, tambem não se mostraram sensiveis à inoculação.

Canidae

Cerdocyon thous azarae WIED. — Foram submetidos à inoculação com 1 cc. da diluição a 1 : 40 de virus Asibi, por via subcutanea, 7 exemplares de cães do mato, dos quais tres jovens, com poucos meses, provenientes de varias localidades do Estado de São Paulo. A pesquisa do virus circulante, feita no 3º e no 14º dias, foi negativa em todos êsses animais. Além da ligeira ascenção termica, não ultrapassando 39º7, observada na maioria nos dias subsequentes à inoculação, atribuivel talvez à excitação dos animais nos primeiros dias de tomada a temperatura, não foram observados outros sintomas. De quatro destes animais, reinoculados, por via cerebral, com 0 cc. 5 de virus neurotropico, no 35º dia, dois apresentaram forte ascenção termica, atingindo até 39º3 em um e 40º6 em outro, sem outras manifestações.

Leporidae

Sylvilagus minensis 1597 ♀. — Inoculado a 1.12.37 com 2 ccs. de diluição a 1 : 40 de virus Asibi por via peritonal, não apresentou sintomas durante a observação, tendo sido notada ligeira ascenção termica no 6º dia. A pesquisa do virus circulante, feita já no 2º dia, foi negativa.

Bradypodidae

Bradypus tridactylus. — Dois exemplares foram inoculados por via peritoneal com 2 ccs. da diluição a 1 : 40 de virus Asibi. Em ambos foi negativa a pesquisa do virus circulante no terceiro dia e em um tambem no decimo dia. Do cerebro e figado de um deles não foi conseguido isolamento do virus no 16º dia. Outro exemplar inoculado por via cerebral com 0 cc. 5 de virus neurotropico morreu dois dias depois, não tendo sido aproveitado.

Felidae

Herpailurus pardinoides GRAY. — Dois gatos do mato, Nos. 1605 e 1614 foram inoculados respetivamente com 0 cc. 5 de virus neurotropico por via cerebral e com 2 ccs. de virus Asibi a 1 : 40 por via peritoneal. Tentativas de obtenção do virus circulante feitas com o primeiro no 3º e 8º dias foram negativas. O segundo amanheceu morto no 7º dia, não tendo sido conseguido isolamento do virus do figado desse animal, morrendo no proprio dia da inoculação todos os camondongos inoculados com êsse material.

Sciuridae

Sciurus aestuans ♂. — Um exemplar, No. 1667, inoculado por via subcutanea com 2 ccs. da diluição a 1 : 15 de virus Asibi a 25.2. Não apresentou sintomas de infecção, não tendo sido conseguido isolamento do virus circulante no 8º, 12º e 15º dias.

CONCLUSÕES

1.ª Não foi conseguido isolamento de virus amarilico natural em animais silvestres, em que foi praticada a pesquisa.

2.ª *Tajassus tajassu*, o pecari ou cateto, é extremamente sensivel à inoculação de virus neurotropico por via cerebral, morrendo com paralisia.

3.ª O virus reisolado do cerebro deste suideo não sofreu alterações no seu comportamento em relação aos camondongos sensiveis, salvo leve e passageira atenuação, mesmo após uma segunda passagem em *Tajassus*.

4.ª O virus neurotropico inoculado por via cerebral em *Tajassus* não circula no sangue a partir do terceiro dia, não sendo tampouco infetante o figado do mesmo animal morto de encefalite.

5.ª A passagem do virus neurotropico em serie parece ser possivel no pecari, pois um segundo animal inoculado com o cerebro do primeiro veiu a morrer infetado.

6.ª A inoculação de virus Asibi por via subcutanea na dose de 1 cc. da diluição a 1 : 20 foi negativa no cateto.

7.ª Não foi possivel reisolar o virus Asibi, inoculado por via subcutanea naquela dose em *Tajassus* jovem, a partir do quinto dia.

8.ª *Cavia aperea* Erxl. (*rufescens?*), a preá, pequeno cavideo extremamente comum no Brasil, é sensivel à inoculação do virus neurotropico por via cerebral.

9.ª O virus neurotropico reisolado do cerebro da preá não parece sofrer alteração sensivel no seu comportamento em relação aos camondongos.

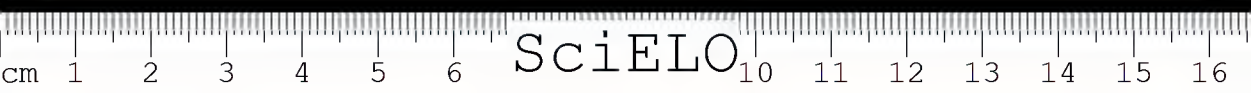
10.ª Não foi conseguido isolamento do virus circulante, 3 dias após a inoculação, em duas preás injetadas por via cerebral com virus neurotropico e em uma inoculada com virus pantropico Asibi, por via peritoneal.

11.ª *Hydrochoerus capybara*, a capivara, é sensivel à inoculação do virus neurotropico por via cerebral, apresentando paralisia.

12.ª Os *Didelphydae* parecem pouco sensiveis ao virus amarilico, quer neurotropico, quer pantropico.

13.ª De um *Didelphys aurita* inoculado por via cerebral com virus neurotropico e morto espontaneamente no 8º dia foi isolado virus do cerebro, o qual se mostrou um tanto atenuado para camondongos, embora passageiramente.

14.ª De um *Didelphys aurita* inoculado por via subcutanea com virus Asibi e morto espontaneamente no 9º dia foi reisolado virus do cerebro.

15.ª Não foi conseguido reisolamento de virus circulante em 14 didelfideos inoculados com virus neurotropico ou pantropico.

16.ª A inoculação de virus Asibi por via testicular em *Didelphys aurita* foi negativa.

17.ª *Nasua narica*, o coati, é sensivel à inoculação do virus neurotropico por via cerebral.

18.ª Não foi obtida infecção do coati com virus Asibi inoculado por via subcutanea, não tendo sido, tampouco, conseguido isolamento do virus circulante.

19.ª *Trahira barbara*, a irára, parece ser sensivel ao virus neurotropico inoculado por via cerebral, porém não ao pantropico injetado por via subcutanea.

20.ª Foi obtido isolamento do virus circulante de *Cabassous unicinctus*, o tatú de rabo mole, cinco dias após a inoculação por via subcutanea de 1 cc. 5 de virus Asibi diluido a 1 :20, não apresentando o animal sintomas de infecção.

21.ª O virus desaparecera do sangue desse *Dasypodidae* já no 10º dia após a inoculação.

22.ª O virus circulante reisolado desse tatú não sofreu alteração do seu comportamento experimental.

23.ª Dois *Dasypus novemcinctus*, inoculados com virus neurotropico por via cerebral, apresentaram sintomas de paralisia respectivamente no 5º e no 9º dias, não tendo, porém, sido conseguido quer o reisolamento de virus do cerebro, quer do sangue.

24.ª Tatús da mesma especie inoculados pelas vias subcutanea e testicular não apresentam infecção, nem virus circulante a partir do 3º dia.

25.ª Foi reisolado virus circulante de um *Dasypus novemcinctus* inoculado dois dias antes com 5 ccs. de virus Asibi a 1 :10 por via peritonal.

26.ª Foram negativas as inoculações subcutaneas de virus Asibi ou as tentativas de isolamento de virus circulante ou ambas, nas seguintes especies de mamiferos. *Coendu prehensilis, Nectomys squamipes, Cerdocyon thous azarae, Sciurus aestuans, Hydrochoerus capybara, Didelphys paraguayensis* e *Marmosa* sps.

27.ª Foram negativas as inoculações intraperitoneais de virus Asibi ou as tentativas de reisolamento de virus circulante dos animais assim inoculados ou ambas, nas seguintes especies: *Sylvilagus minensis, Bradypus tridactylus, Dasyprocta aguti* e *Herpailurus pardinoides.*

28.ª Foram negativas as inoculações de virus neurotropico praticadas por via cerebral, bem como as pesquisas de virus circulante, nas seguintes especies: *Mus musculus musculus, Rattus norvegicus, Muridae* spp., *Herpailurus pardinoides. Euphractes sexcinctus. Didelphys paraguayensis.*

29.ª Os resultados negativos obtidos após inoculação cerebral de virus neurotropico em *Mus musculus musculus* demonstram que nesta sub-especie

a exemplo do que recorre com *Mus musculus albinus*, tambem existem raças de sensibilidade diversa ao virus amarilico, o que provavelmente tambem acontecerá a outras especies animais, como parece ser o caso para os gatos domesticos (34).

BIBLIOGRAFIA

1. *Stokes, A.; Bauer, J. H. & Hudson, N. P.* — J. Amer. Med. Assn. 90(4):253.1928.
2. *Monteiro, J. Lemos* — Brasil Medico 44:1087.1930.
3. *Aragão, H. de B.* — Brasil-Medico 42:727.1928.
4. *Findlay, G. M.* — Trans. Royal Soc. Trop. Med. a. Hyg. 27(5):437.1934.
5. *Nicolau, S. & Baffet, O.* — Bull. Soc. Path. Exot.8:611.1937.
6. *Kumm, H. W.* — Ann. Trop. Med. a. Parasit. 26(2):297.1932.
7. *Kuczinski, M. H. & Hohenadel, B.* — Lancet 218:180.1930.
8. *Sellards, A. W.* — South. Med. Journ. 23(2):121.1930.
9. *Dinger, J. E.; Schüffner, W. A. P. & Snijders, E. P.* — Centralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 119:1.1931.
10. *Sawyer, W. A. & Frobischer, M.* — 1.er Congrès Inter. Microbiol., Paris 2:476.1932.
11. *Theiler, M.* — Amer. Journ. Trop. Med. 13(4):399.1933.
12. *Stephanopoulo, G. J. & Wassermann, R.* — Bull. Soc. Path. Exot. 26(4):557.1933.
13. *Lloyd, W. D. M.; Penna, H. A. & Mahaffy, A.* — Amer. Journ. Hyg. 18(2):323.1933.
14. *Stephanopoulo, G. J.* — Ann. Inst. Pasteur 52(5):553.1934.
15. *Nicolau, S.; Mathis, M. & Baffet, O.* — C. R. Soc. Biol. 122(17):203.1936.
16. *Findlay, G. M. & Stern, R. O.* — Journ. Path. a. Bact. 40(2):311.1935.
17. *Findlay, G. M.* — Journ. Path. a. Bact. 38(1):1.1934.
18. *Nicolau, S.; Kopciowska, L.; Mathis, M. & Baffet, O.* — C. R. Soc. Biol. 116:820.1934.
19. *Cowdry, E. V. & Kitchen, S. F.* — Amer. Journ. Hyg. 11(2):227.1930.
20. *Lloyd, W. D. & Penna, H. A.* — Amer. Journ. Trop. Med. 13(1):1.1933.
21. *Findlay, G. M.* — Journ. Path. a. Bact. 38(1):1.1934.
22. *Laigret, J.* — C. R. Acad. Sciences 196(7):508.1933.
23. *Stephanopoulo, G. J.; Mollaret, P. & Desmos, E.* — Bull. Soc. Path. Exot. 27(9):816.1934.
24. *Findlay, G. M.* — Trans. Royal Soc. Trop. Med. a. Hyg. 27(5):437.1934.
25. *Findlay, G. M. & Clarke, L. P.* — Trans. Royal Soc. Trop. Med. a. Hyg.28(2):193.1934.
26. *Findlay, G. M. & Clarke, L. P.* — Trans. Royal Soc. Trop. Med .a. Hyg. 28(3):335.1934.
27. *Theiler, M. & Smith, H. H.* — Journ. Exper. Med. 63(6):787.1937.
28. *Thiroux, A.* — Presse Médicale 45(76):1349.1937.
29. *Findlay, G. M.; Hewer, T. F. & Clarke, L. P.* — Trans. Royal Soc. Trop. Med. a. Hyg. 28(4):413.1935.
30. *Stephanopoulo, G. J.; Nagano, J. & Wassermann, R.* — Bull. Soc. Path. Exot. 30(10):892.1937.
31. *Sawyer, W. A. & Frobischer, M.* — 1er Congrès Intern. Microbiologie, Paris 2:476.1930.
32. *Whitman, L.* — Journ. Immunology 29(2):99.1935.
33. *Sawyer, W. A.; Lloyd, W. D. & Kitchen, S. F.* — Journ. Exper. Med. 50(1):1.1929.
34. *Fonseca, F. da & Artigas, P.* — C. R. Soc. Biol. 129(34):1143.1938 *et* Mem. Inst. Butantan 12: .1939.

(Trabalho da Secção de Parasitologia e Protozoologia do Instituto Butantan. Dado á publicidade em Junho de 1939).

Mem. Inst. Butantan
Vol. XII — 1938-39

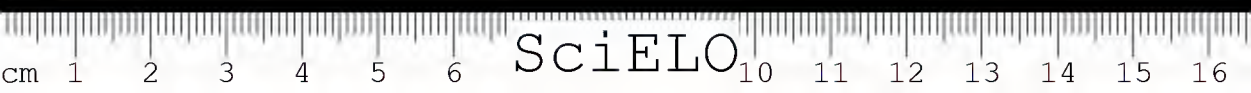



Fig. 1

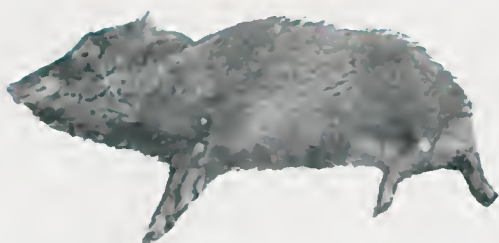



Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

616.928

RECHERCHES SUR LA SENSIBILITÉ D'ANIMAUX SAUVAGES AU VIRUS AMARIL

PAR

FLAVIO DA FONSECA ET PAULO ARTIGAS

Contrairement à ce qu'on pourrait attendre de l'importance acquise au cours de ces dernières années par le problème de la fièvre jaune forestière en Afrique et en Amerique du Sud, le nombre d'animaux sauvages et domestiques dont la sensibilité au virus amaril a été recherchée est relativement très réduit.

A l'exception des primates on ne possède des renseignements sur la positivité de l'inoculation avec du virus neurotrope ou Asibi que chez les espèces suivantes: *Canis familiaris* et *Felis catus* [Monteiro (2) et Nicolau et Baffet (5)], *Cavia porcellus* [Sellards (8) et d'autres], *Dasyprocta aguti* [Lloyd et Penna (13)], *Microtus agrestis* [Findlay (21)], *Mus musculus musculus, Mus musculus gentilis* et *Mus musculus azoricus* [Laigret (22) et Stephanopoulo (14)], Rat sp. [Findlay (21)], *Sciurus vulgaris* [Findlay (21)], *Cytilus cytilus* [Stephanopoulo, Nagano et Wassermann (30)], *Sus scrofa* [Stephanopoulo, Mollaret et Desnos (23)], *Rana catesbiana* [Sawyer et Frobischer (31)], *Erinaceus europeus* [Findlay (24)] et *Atelerix albiventris* = *Erinaceus pruneri* [Findlay, Hewer et Clarke (29)]. Des résultats négatifs ont été constatés chez *Evolomys glareolus, Apodemus sylvaticus, Oryctolagus cuniculi, Putorius foetidus, Cricetus auratus,* pigeon, poule et canaris [Findlay (21)], *Molossus obscurus, Desmodus rufus* [Kumm (6)] et *Rana temporaria* [Stefanopoulo, Nagano et Wassermann (30)].

Au cours des années 1937 et 1938 il nous fut possible de réaliser des recherches au sujet de la sensibilité de quelques mammifères brésiliens au virus amaril, grâce au concours du Service de Défense contre la Fièvre Jaune de l'Etat de São Paulo, dirigé por le Deur H. de Beaurepaire Aragão, que nous tenons à remercier pour le matériel que ce Service nous a fourni.

Les virus utilisés dans ces experiences furent l'Asibi (No. 40.087) et le neurotrope (F. 654) fournis au Service de Défense contre la Fièvre Jaune par la Commission Rockeffeller. Le virus Asibi fut conservé au laboratoire après

dessication dans le vide d'après la technique de Sawyer, Lloyd et Kitchen (33) et le virus neurotrope fut entretenu par passages successifs sur des souris blanches de la souche Swiss.

Des recherches que nous avons realisées au laboratoire de Parasitologie de l'Institut Butantan derivent les conclusions suivantes.

1ère — Il n'a pas été possible de constater la présence de virus amaril naturel chez aucun des nombreux animaux capturés à l'état sauvage dont le sang fut inoculé par voie intracérbrale à des souris blanches.

2ème — *Tajassus tajassu*, le pécari, est très sensible à l'inoculation cérébrale du virus neurotrope, qui est suivie de paralysie et mort de l'animal.

3ème — Le passage en série semble possible, puisqu'un deuxième *Tajassus* inoculé avec du cerveau du premier succomba paralysé.

4ème — Le virus réisole de nouveau du cerveau du 2ème *Tajassus* n'a montré qu'une fugace atténuation pour les souris blanches.

5ème — Il n'a pas été possible d'isoler de virus circulant de ces *Tajassus* dès le 3ème jour qui suivit l'inoculation.

6ème — L'inoculation souscutanée d'un jeune péccari avec 1 c.c. d'une dilution à 1:20 de virus Asibi fut négative, aussi bien que la tentative d'isolement de virus circulant, faite au 5ème jour.

7ème — *Cavia aperca* (*rufescens?*), un cobaye sauvage très commun au Brésil, est sensible à l'inoculation cérébrale du virus neurotrope.

8ème — Le virus isolé de nouveau du cerveau de *Cavia aperca* ne montra pas d'altération sensible dans son comportement vis-à-vis des souris blanches.

9ème — Nous n'avons pas réussi à isoler le virus circulant trois jours après l'inoculation cérébrale de deux *Cavia aperca* avec du virus neurotrope et trois jours après l'inoculation intrapéritonéale d'un autre avec du virus Asibi.

10ème — *Hydrochoerus capybara*, le plus grand rongeur connu, est sensible à l'inoculation cérébrale du virus neurotrope, il présente des phenomènes de paralysie, le virus inoculé ne circulant pas à partir du troisième jour.

11ème — L'inoculation intrapéritonéale de virus Asibi au capybara fut négative.

12ème — Les *Didelphydae* semblent être peu sensible à l'inoculation du virus amaril, tant neurotrope que pantrope.

13ème — Il fut néanmoins possible d'isoler du virus neurotrope du cerveau d'un *Didelphys aurita* mort spontanément à l'huitième jour aprés l'inoculation intracérébrale, et du virus Asibi du cerveau d'un autre mort au 9ème jour de l'inoculation souscutanée.

14ème — Il ne fut pas possible d'isoler le virus circulant neurotrope ou pantrope chez 14 Didelphydés inoculés.

15ème — L'inoculation intratesticulaire de virus Asibi fut négative chez un *Didelphys aurita*.

16ème — *Nasua narica*, le coati, meurt paralytique quand on l'inocule par voie cérébrale avec du virus neurotrope.

17ème — L'inoculation souscutanée du coati avec du virus Asibi, aussi bien que la tentative d'isolement du virus circulant faite à l'huitième jour ont echoué,

18ème — *Tahira barbara* semble être sensible à l'inoculation intracérébrale de virus neurotrope, présentant des symptômes de paralysie cinq jours après. Le réisolement du virus du cerveau fut impossible à cause de la toxicité des organes de cet animal pour les souris.

19ème — L'inoculation souscutanée de 2 c. c. d'une dilution à 1:40 du virus Asibi a été négative chez *Tahira barbara*, l'isolement du virus circulant etant empêché par le même motif exposé ci-dessus.

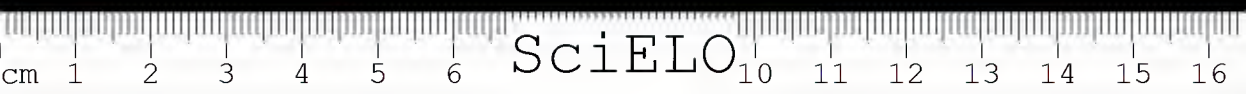
20ème — Chez un tatou, *Cabassous unicinctus*, bien qu'il ne présentât pas des symptômes d'infection, il fut possible de réisoler le virus circulant cinc jours après l'inoculation souscutanée d'un centimètre cubique et demi d'une dilution à 1:20 de virus Asibi. Le virus réisolé na présenta pas des modifications de comportement expérimental. Une nouvelle tentative d'isolement échoua le 10ème jour.

21ème — Deux tatous de l'espèce *Dasypus novemcinctus* inoculés avec du virus neurotrope par voie cérébrale présentèrent paralysie respectivement au 5ème et au 9ème jour, mais il ne fut pas possible de réisoler le virus a partir du cerveau ou du sang.

22ème — Chez un *Dasypus novemcinctus* inoculé deux jours auparavant par la voie péritonéale avec 5 c. c. de virus Asibi dilué au 10ème il fut possible d'isoler du virus circulant.

23ème — L'inoculation souscutanée de virus Asibi ou la tentative d'isolement de virus circulant ou les deux ont echoué chez les espèces suivantes: *Coendu prehensilis*, *Nectomys squamipes*, *Sciurus aestuans*, *Hydrochoerus capybara*, *Cerdocyon thous azarae*, *Didelphys paraguayensis* et *Marmosa* sp.

24ème — L'inoculation intrapéritoneále du virus Asibi ou les tentatives de réisolement du virus circulant ou les deux ont été négatives avec *Sylvilagus minensis*, *Bradypus tridactylus*, *Dasyprocta aguti* et *Herpailurus pardinoides*.

25ème — L'inoculation cérébrale du virus neurotrope, aussi bien que la recherche du virus circulant, ont échoué chez *Mus musculus musculus*, *Epimys nor-*

vegicus, Muridae spp., *Euphractes sexcinctus, Didelphys paraguayensis* et *Herpailurus pardinoides.*

26ème — Les résultats négatifs observés chez *Mus musculus musculus* après l'inoculation cérébrale de virus neurotrope s'opposant aux résultats positifs déjà enregistrés dans la littérature de la fièvre jaune, démontrent l'existence chez cette sous-espèce, comme chez *Mus musculus albinus,* de races de sensibilité différente à l'égard de l'inoculation du virus amaril, ce qui serait aussi vraisemblablement le cas pour d'autres espèces animales.

(Trabalho da Secção de Parasitologia e Protozoologia do Instituto Butantan. Dado à publicidade, em resumo, in C. R. Soc. Biol. 129(34).1938).

612.398.8:616.93

TECNICA DO PREPARO DA TOXINA E ANTITOXINA DIFTERICA NO INSTITUTO BUTANTAN

POR

JANDYRA PLANET DO AMARAL

As grandes dificuldades que encontramos ao iniciar a preparação da antitoxina difterica, dificuldades estas que deverão surgir a cada tecnico que principia o preparo da toxina homologa em grande escala, nos levam à publicação deste trabalho onde procuramos coordenar algumas observações de nossa experiencia.

Todos os pesquisadores que procuraram aperfeiçoar a fabricação do soro anti-difterico concordam que o elemento primordial para a fabricação deste, é um antigeno de alto valor. Assim Glenny, Ramon, Schmidt e muitos outros afirmam em experiencias comprovadas que um bom soro depende de um bom antigeno. Schmidt demonstrou, em 1931, que uma toxina com menos de 8 u. f. não deve ser usada para imunização. É bem verdade que o conceito estabelecido por Ramon, que certas substancias inespecificas adicionadas ao antigeno melhoram de algum modo a produção de anticorpos, tem grande valor na fabricação de soros: mas ficará sempre num plano secundario, pois não suprirá nunca o valor de um bom antigeno.

Baseados nestes conhecimentos é que o problema da fabricação de uma toxina difterica potente apresenta-se logo ao tecnico que tem necessidade de preparar um soro terapeutico.

Meio de cultura — Si examinarmos a literatura sobre a toxina difterica podemos notar que a quantidade de trabalhos com receitas e detalhes sobre o seu preparo é bem grande, em relação á aparencia simples do assunto. Do simples caldo Martin até os meios mais complicados, ha um numero enorme de formulas sendo interessante notar que em geral a receita dada por um experimentador, outro a reproduz com um pequeno detalhe de alteração que em suas mãos dá melhor resultado. Desta maneira nos parece que, diferenças de condições locais e da materia prima fizeram do preparo da toxina difterica um problema a ser resolvido de maneira propria em cada pais, em cada região, em cada laboratorio. Sordelli, em 1935, chama com insistencia a atenção sobre êsse ponto que tambem jul-

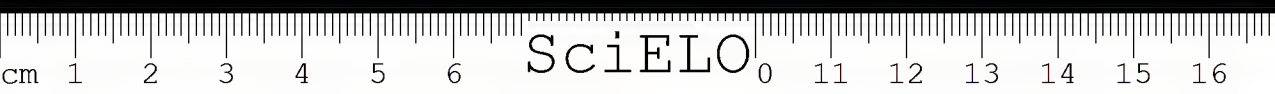
gamos de suma importancia, pois varias formulas foram por nós experimentadas com resultados sempre pouco satisfatórios. Hoje que conseguimos regular uma serie de detalhes circunstancias, obtemos resultados em um meio muito simples e de facil preparo.

A um quilo de carne de vitela, desembaraçada de gorduras e nervos e passada por maquina, são adicionados 2 litros dagua distilada. Deixa-se a 37° durante mais ou menos 15 horas. Dá-se uma fervura de 5 minutos, passa-se num pano e filtra-se em papel de filtro. Adiciona-se 3% de peptona Witt farmaceutica e 0.5 de cloreto de sodio; dissolvem-se estes ingredientes, alcaliniza-se a 7.7 — 7.8 com soda normal, leva-se ao autoclave a 120 por 20 minutos. Filtra-se a quente em papel fino e distribui-se em balões de maneira que a camada liquida tenha mais ou menos 1.5 cc. de altura. (300 ccs. em balões de Fernbach com capacidade de 2 litros). Esteriliza-se a 110° por 30 minutos. A este caldo é adicionado na ocasião do repique acetato de sodio na proporção de 5 gs. por 1.000 e glicose na razão de 2 gs. por 1.000. O acetato e a glicose funcionando com substancias economizadoras do consumo proteico têm papel preponderante na elevação da D.M.L. da toxina.

Reação do meio de cultura. — Devemos lembrar que o pH usado por nós está entre 7,5 e 7,8: num caldo mais acido ou mais alcalino não logramos obter toxinas razoaveis.

Amostra usada — sua conservação. — A amostra usada é a Park 8. Esta, além de cultivada em meio de Loeffler para a conservação da cultura, é transplantada cada 2 ou 3 dias em tubos contendo o proprio caldo preparado para o fabrico da toxina. Desta maneira procura-se conservar a toxigenicidade da amostra pela sua maior adaptação ao meio. Destes tubos será a cultura transplantada para um balão intermediario que apresenta formação intensa de pele já em 48 horas; deste balão é feito o transplante ultimo, sendo suficiente para mais ou menos 25 outros. Estes ao fim de 48 horas apresentam uma pele espessa, sendo a massa do caldo transparente.

Si por um lado é razoavel que a adaptação da amostra ao meio de cultivo aumenta sua toxigenicidade, por outro sabemos que uma cultura em transplantes sucessivos e frequentes dissocia, quasi sempre com perda de suas propriedades de virulencia e toxigenicidade. Foi o que verificámos no decorrer do nosso serviço de rotina: com um numero excessivo de passagens perde-se a toxigenicidade da amostra, o que se exterioriza no caldo por uma formação de peles finas e quebradiças.

Felippe M. quando propõe a conservação das culturas do Park 8 sob oleo de vaselina lembra tambem êsse detalhe. Vejamos estes 4 exemplos com passagens diferentes do Park 8 experimentadas em condições perfeitamente identicas:

Park 8 — 7 passagens . D.M.L. = 1/700 Park 8 — 8 mêses em passagens .... D.M.L. = 1/300	Park 8 — 10 passagens . D.M.L. = 1/700 Park 8 — 7 mêses em passagens .... D.M.L. = 1/500
Park 8 — 20 passagens . D.M.L. = 1/500 Park 8 — 8 mêses em passagens .... D.M.L. = 1/400	Park 8 — 30 passagens . D.M.L. = 1/1000 Park 8 — 70 " . D.M.L. = 1/200 Park 8 — 90 " . D.M.L. = 1/200 Park 8 — 1 ano em passagens .... D.M.L. = 1/100

Vemos que a D.M.L. da cultura muito antiga em passagens, é sempre maior que a das culturas mais recentes.

Os olhos de um tecnico acostumado, raramente se enganam com o aspecto de uma cultura que irá dar uma toxina forte; o crescimento luxuriante das peles que se formam à superficie do caldo e caem depois para se depositarem em camadas no fundo do balão, dando aparecimento a novas peles, a tonalidade escura que toma o caldo, são indicios quasi seguros de caldos muito toxicos.

Um serviço de soroterapia desde que se tenha em mãos toxinas de titulos altos torna-se grandemente facilitado, conhecimento teorico que podemos comprovar si relacionarmos o serviço de imunização destes 3 ultimos anos com a produção de toxinas neste mesmo espaço de tempo.

QUADRO 1

Quantidade de toxina difterica produzida em relação à D. M. L. nestes tres ultimos anos

1936		1937		1938	
D.M.L.	Quantidade	D.M.L.	Quantidade	D.M.L.	Quantidade
1/100	23.000 ccs.	1/100	—	1/100	—
1/200	54.000 ccs.	1/200	—	1/200	—
1/300	22.000 ccs.	1/300	—	1/300	—
1/400	5.000 ccs.	1/400	6.000 ccs.	1/400	—
1/500	1.500 ccs.	1/500	11.000 ccs.	1/500	24.000 ccs.
1/600	—	1/600	36.000 ccs.	1/600	33.000 ccs.
1/700	—	1/700	82.000 ccs.	1/700	97.000 ccs.
1/800	—	1/800	34.000 ccs.	1/800	22.000 ccs.
1/900	—	1/900	—	1/900	6.000 ccs.
1/1.000	—	1/1.000	51.000 ccs.	1/1.000	141.000 ccs.
1/1.200	—	1/1.200	—	1/1.200	9.500 ccs.
Titulo medio — 1/200		Titulo medio — 1/750		Titulo medio — 1/820	

QUADRO 2

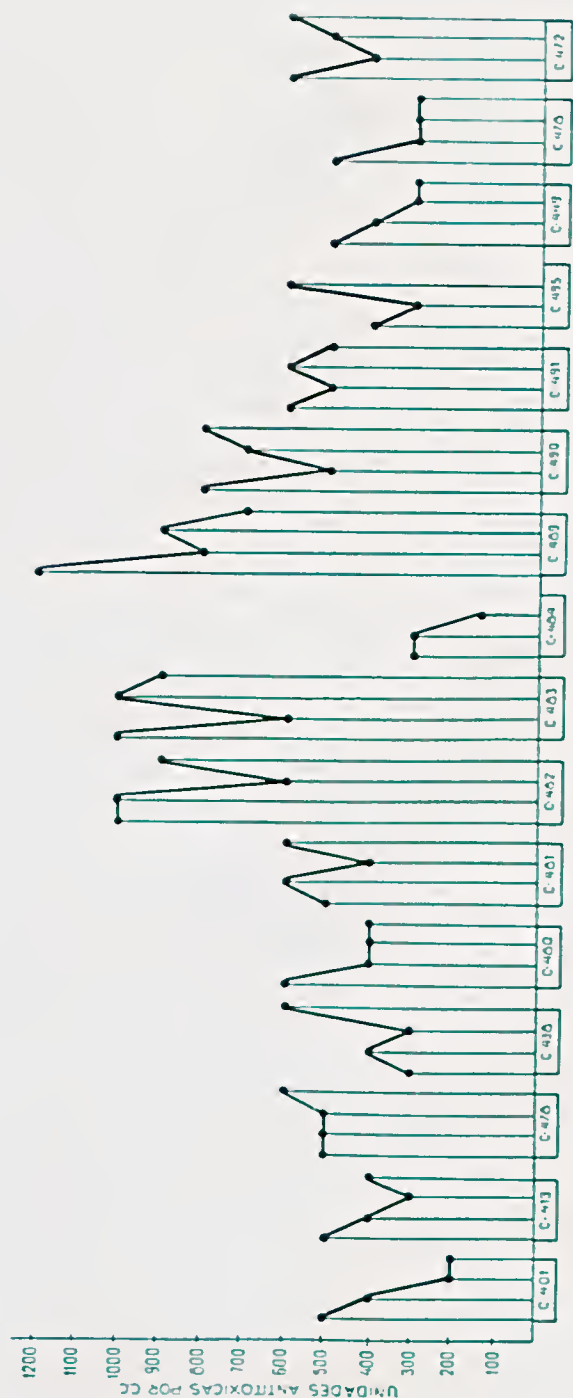
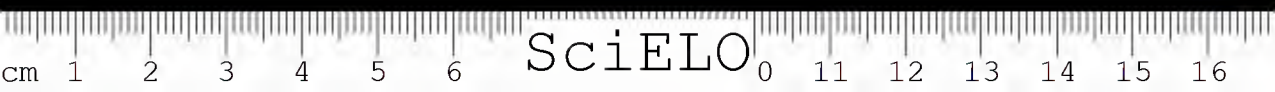
Relação entre os mais altos titulos antitoxicos alcançados pelos animais nos ultimos 3 anos

1936			1937			1938		
Unidades antitoxicas por cc.	Quantidade de cavalos	Percentagem	Unidades antitoxicas por cc.	Quantidade de cavalos	Percentagem	Unidades antitoxicas por cc.	Quantidade de cavalos	Percentagem
200	12	30	>300	24	25	>300	5	12,8
<200	28	70	300	29	30,8	300	5	12,8
<500			400	17	18	400	5	12,8
—	—	—	500	9	9,5	500	4	10,2
—	—	—	600	5	5,3	600	5	12,8
—	—	—	700	5	5,3	700	2	5,1
—	—	—	800	—	—	800	2	5,1
—	—	—	900	4	4,2	900	2	5,1
—	—	—	1.000	1	1	1.000	6	15,3
—	—	—	1.200	—	—	1.200	1	2,5
—	—	—	1.500	—	—	1.500	1	2,5
—	—	—	2.000	—	—	2.000	—	—
—	—	—	2.500	—	—	2.500	1	2,5
TOTAL — 40 animais			TOTAL — 94 animais			TOTAL — 39 animais		

Pela comparação dos Quadros 1 e 2 notamos que a uma D. M. L. mais alta estão relacionadas as melhores porcentagens de titulos antitoxicos dos animais imunizados. Em 1936 quando a D.M.L. média foi 1/200 não conseguimos titulos antitoxicos de 500u. por cc. Em 1937, com toxina já melhorada, mas em menor quantidade que em 1938, temos porcentagens intermediarias, mais altas que no primeiro ano e mais baixas que neste ultimo. Em 1938, com uma D.M.L. media de 820 u. temos um titulo antitoxico medio de 720 u., e ainda porcentagem bem regular para titulos mais altos como seja 15,3% para 1.000 unidades. A porcentagem de animais com titulos inaproveitaveis (menos que 300 unidades) baixa bastante em 1938, sendo de 12,8%. É sabido que o animal para apresentar um teor alto de antitoxina difterica, deve possuir uma certa imunidade natural; deste modo por mais potente que seja um antigeno haverá sempre uma porcentagem de animais que não produzem titulos antitoxicos aproveitaveis. Savino em bem organizadas estatisticas, estabelece uma media de 31% de animais maus produtores de antitoxina. Desta maneira nossa porcentagem de 2,8%, em 1938, nos parece bem razoavel.

Com relação ao processo de imunização empregámos um metodo ha muitos anos adotado neste Instituto (Metodo de Dean) que nos parece excelente, pois

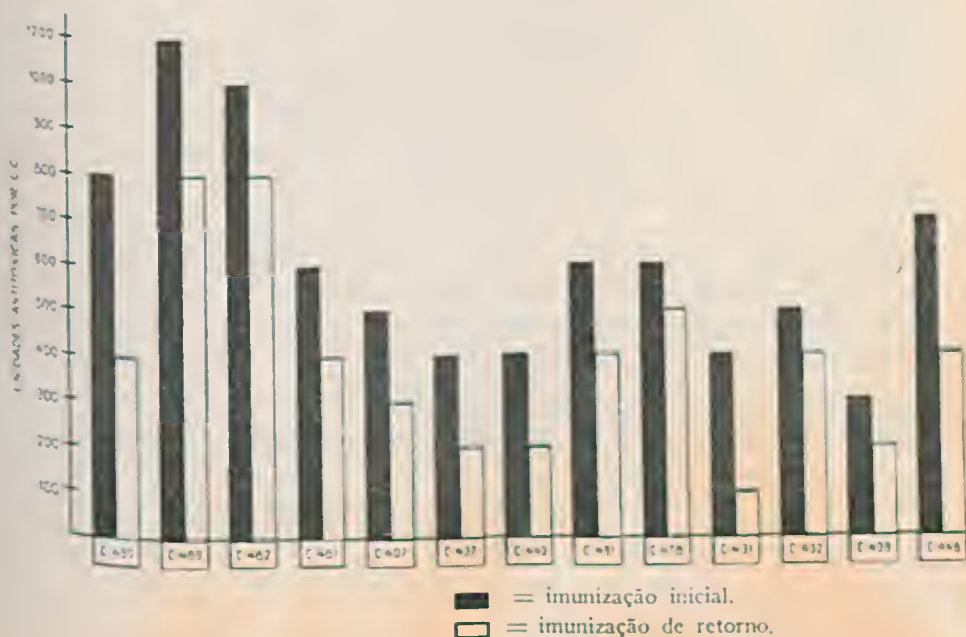
ANTITOXINA DIFTERICA

Quadro 3 — Relação entre os titulos antitoxicos alcançados no decurso das diferentes sangrias

raramente temos deparado com animais, que tendo ingressado em serviço com idade suficiente e em boas condições de saude, apresentem reações tão intensas que o impossibilitem de suportar o ritmo da imunização. Começando com quantidade infima de toxina (0,01cc.) o animal em doses crescentes deverá apresentar o titulo antitoxico maximo quando receber de 250 a 300 ccs.. Neste ponto será sangrado 3 a 4 vezes com intervalo de 15 dias entre duas sangrias. Frequentemente nas ultimas sangrias o titulo baixa, se bem que existam exceções para as quais não encontramos ainda nenhuma explicação. Pela esquematização abaixo dos diferentes titulos alcançados nas varias sangrias de 16 cavalos podemos verificar que para cada animal ha uma particular alternativa de titulos.

Como ponto geral, podemos no entanto concluir que, com exceção de 3 animais nos quais o titulo mais alto não se apresenta na primeira sangria, os restantes têm um titulo antitoxico medio reduzido em relação ao volume total do sangue. Em nosso serviço o animal depois de sangrado numa media de 15 litros de sangue entra em descanço, retornando a este após tres meses. Nas possibilidades apresentadas pelo Instituto, o animal de retorno ao serviço já não oferece os titulos alcançados na primeira imunização.

Sempre que é praticada uma segunda imunização, o titulo maximo alcançado é inferior ao primeiro o que se poderá verificar no esquema 4 que mostra a relação entre duas imunizações sucessivas em 13 diferentes animais. Não é raro ainda a morte do animal durante o periodo de descanço. A possibilidade do aproveitamento dos cavalos de titulos antitoxicos muito baixos será objeto de um trabalho especial.

QUADRO 4

Relação entre os mais altos titulos alcançados pelos animais na imunização inicial e na de retorno

Considerando o valor de uma unidade antitoxica relacionada com preço da manutenção de um animal em descanço, nos parece que, se as possibilidades de aquisição de animais não fossem restritas, a sangria a branco dos animais imunizados seria preferivel no ponto de vista economico.

RESUMO

O A. refere e discute as condições de processo e obtenção de toxina e antitoxina difterica no Instituto Butantan.

ABSTRACT

The author reports and dicusses the condition of the process and obtaining of diphtheric toxin and antitoxin at the Instituto Butantan.

BIBLIOGRAFIA

1. *Glenny, A. T.* — The Lancet 221:402.1931.
2. *Ramon, G.* — C. R. Soc. Biologie 104:842.1930.
3. *Schmidt, S.* — C. R. Soc. Biologie 106:308.1931.
4. *Sordelli, A.* — Rev. Inst. Bact. Bs. Aires 6:687.1935.
5. *Abt, G. & Loiseau, G.* — Ann. Inst. Pasteur 36:535.1922.
6. *Hartley, P. & Hartley, O. M.* — J. of. Path. & Bact. 25:458.1921/22.
7. *Hartley, P.* — J. of Path. & Bact. 25:479.1921/22.
8. *Dernby, K. G. & David, H.* — J. of Path. & Bact. 24:150.1920/21.
9. *Loiseau, G. & Philipe, M.* — C. R. Soc. Biologie 109:168.1932.
10. *Marbe, M., Dimitriu, O. & Stefanesco, V.* — C. R. Soc. Biologie 113:487.1933.
11. *Loiseau, G. & Philipe, M.* — C. R. Soc. Biologie 116:1214.1934.
12. *Wadsoworth, A. & Wheeler, M.* — Bull. Inst. Pasteur 23:441.1935.
13. *Pappenheimer, A. M. & Johnson, S. J.* — Brit. J. Exper. Path. 17:335.1936.
14. *Mustafa, A.* — C. R. Soc. Biologie 126:558.1937.
15. *Bordet, P.* — Bruxelles Médical 18:1220.1938.
16. *Hida, Otoichi & Suzuki, Sabuo* — Kitasato Arch. Exper. Med. 14:263.1937.
17. *Pappenheimer, A. M. & Johnson, S. J.* — Brit. J. Exper. Path. 18:239.1937.
18. *Marbé, M. & Olariu, A.* — Bull. Inst. Pasteur 34:273.1936.
19. *Heeren, Ralph H.* — J. Inf. Diseases 46:161.1936.
20. *Philippe, M.* — C. R. Soc. Biologie 126:170.1937.
21. *Taylor, Mlle. E. M.* — Ann. Inst. Pasteur 55:474.1935.
22. *Savino, E.* — C. R. Soc. Biologie 105:717.1930.
23. *Ramon, G.; Lemetayer, E. & Hamedy, A.* — C. R. Soc. Biologie 106:1228.1931.

(Trabalho da Secção de Imunologia do Instituto Butantan. Recebido em novembro de 1938. Dado à publicidade em Junho de 1939).

612.398.8:614.512:616.93

O EMPREGO DE LANOLINA NA IMUNIZAÇÃO DE CAVALOS PARA PRODUÇÃO DE ANTITOXINA DIFTERICA

POR

JANDYRA PLANET DO AMARAL

Ramon, em uma serie de trabalhos demonstrou, desde 1926, que substancias inespecificas adicionadas aos antigenos têm considerada importancia na elevação da producção de anticorpos. Estas observações tiveram inicio com a verificação feita por aquele pesquisador, em 1925, do teor das antitoxinas difitericas e tetanicas nos cavalos que apresentavam abcessos durante o processo de imunização. Esta verificação mostrou a importancia de certas reações locais na produção de anticorpos. Que este estimulo poderia ser obtido por abcessos aceticos ficou ulteriormente demonstrado, pela junção aos antigenos de substancias inertes tais como a tapioca pulverizada, o cloreto de calcio e o alumen, sendo que este ultimo com ação nitidamente superior aos primeiros.

Mais recentemente, Ramon e seus colaboradores estudam a ação de diversas substancias sucetiveis de, pela união com as vacinas microbianas, toxinas ou anatoxinas, aumentar a produção de anticorpos especificos. Ramon, Lemetayer, Richou, estudaram em animais de laboratorio a influencia de numerosas outras substancias sobre a ação imunizante das anatoxinas tetanica e difterica. A analise do efeito coadjuvante destas substancias estudadas, selecionou como as mais ativas a colesterina e a lanolina, sendo que esta ultima ainda se mostra mais ativa quando misturada ao oleo de oliva.

Ramon e Lemetayer, inoculando carneiros e cavalos com anatoxina tetanica só e adicionada de lanolina e oleo de oliva, obtêm uma maior imunidade neste segundo caso. Thibault e Richou em experiencias feitas em coelhos e cobaias, estudaram a influencia de diversas substancias adicionadas seja á anatoxina diphterica, seja à tetanica, e concluiram que a imunidade antitoxica provocada por qualquer destes antigenos, é acrescida em proporções mais ou menos fortes quando este é incorporado a uma mistura de lanolina mais oleo de oliva, porém que a influencia da lanolina é variavel segundo a especie animal; assim é mais pronunciada na cobaia do que no coelho; na mesma ordem de ideas já

se havia verificado que a junção da tapioca que favorece tão altamente a produção de antitoxina nos cavalos é quasi sem efeito nas cobaias.

M. Weinberg e Mlle. Guillaumie têm utilizado com sucesso este novo principio usando o antigeno incorporado á lanolina mais oleo de oliva na preparação do soro anti-vibrião-septico. Mais recentemente Weinberg e Kreuguer obtiveram por esse mesmo processo um soro anti-butolinico bivalente. Em trabalho recente Pagniez conclui que o metodo de Ramon é sucetivel de interessante aplicação no estudo das cito-toxinas. As proprias condições que regulam a produção de antitoxina difterica neste Instituto, condições essas estipuladas detalhadamente em publicação anterior, nos levaram a experimentar o processo de Ramon em cavalos, como medida economica na produção industrial desta antitoxina. Era nosso fim principal a possibilidade do aproveitamento dos cavalos que tendo sofrido uma imunização anterior, apresentavam titulos antitoxicos baixos, e que sem esta possibilidade deveriam ser afastados, sem alternativa de poderem ser substituidos. Fizémos primeriamente uma experiencia prévia em tres animais — pois que como ficou visto acima o comportamento das especies animais em relação a estes estimulos inespecificos, não pode ser avaliada a priori, e em relação ao antigeno difterico inoculado em cavalo conjuntamente com lanolina não conhecemos nenhuma observação. Em nossas experiencias utilizámos os cavalos que tendo já sofrido imunização anterior pelo processo comumente usado no laboratorio, apresentavam titulo antitoxico igual ou inferior a 200 u.i. por cc..

Tratando-se de cavalos em retorno de imunização, iniciámos as injeções com com 10 cc. de toxina adicionada de volume igual de uma mistura de oleo + lanolina na proporção de 2/3 da primeira substancia para 1/3 da segunda. A quantidade de toxina foi dobrada em cada injeção seguinte e o aumento da lanolina mais oleo foi de 10 ccs. para cada dose, até 250 ccs. onde o volume de lanolina mais oleo, alcançou 70 ccs.. A mistura de toxina com lanolina mais oleo se faz rapidamente, dando aparecimento a um liquido leitoso, facilmente injetavel. O intervalo entre duas injeções as mais das vezes precisou ser maior que na imunização comum, onde os animais são injetados cada dois dias durante as doses iniciais e com intervalo de 4 dias para as maiores. Isto se verificou em virtude das reações intensas apresentadas pelos cavalos. As dosagens de prova e as sangrias foram praticadas pela mesma maneira que na imunização comum.

TABELA 1

Relação entre os mais altos titulos antitoxicos alcançados pelos cavalos em imunização simples e com o antigeno + lanolina + oleo de oliva

Animal No.	Maior titulo alcançado em imunização simples (Met. Dean)	Maior titulo alcançado em imunização pelo Met. de Dean + lanolina + oleo de oliva
400	200 u. por cc.	500 u. por cc.
401	<200 " " "	500 " " "
404	<200 " " "	300 " " "
450	200 " " "	500 " " "
451	<200 " " "	300 " " "
452	<200 " " "	400 " " "
454	<200 " " "	300 " " "
455	<200 " " "	300 " " "
409	200 " " "	300 " " "
407	200 " " "	700 " " "
477	<200 " " "	300 " " "
442	250 " " "	700 " " "
416	<200 " " "	500 " " "
424	<200 " " "	<200 " " "
406	200 " " "	600 " " "
411	<200 " " "	300 " " "
456	200 " " "	600 " " "
476	200 " " "	<200 " " "
466	200 " " "	<200 " " "
400 B	100 " " "	300 " " "
448	200 " " "	500 " " "
456 B	200 " " "	300 " " "
484	200 " " "	200 " " "
488	200 " " "	200 " " "

TABELA 2

Relação entre os pesos iniciais e finais nos cavalos em imunização simples e com antigeno + lanolina e oleo de oliva

Cavalo N.º	Imunização simples (metodo de Dean)		Imuniz. Metodo de Dean Com lanolina + oleo de oliva	
	Peso inicial	Peso final	Peso inicial	Peso final
400	325 kgs.	340 kgs.	350 kgs.	285 kgs.
401	285 "	275 "	285 "	226 "
404	305 "	350 "	360 "	340 "
450	310 "	300 "	310 "	265 "
451	315 "	315 "	345 "	280 "
452	305 "	314 "	335 "	260 "
454	280 "	290 "	315 "	285 "
455	290 "	310 "	314 "	240 "
409	300 "	300 "	305 "	285 "
407	310 "	338 "	355 "	315 "
442	356 "	350 "	420 "	380 "
416	255 "	260 "	245 "	215 "
424	295 "	300 "	304 "	280 "
406	260 "	300 "	270 "	226 "
411	275 "	260 "	265 "	230 "
456	305 "	320 "	320 "	285 "
400B	280 "	305 "	270 "	265 "
448	332 "	335 "	320 "	295 "
456B	295 "	305 "	290 "	310 "
484	380 "	335 "	220 "	225 "
488	315 "	305 "	300 "	280 "

Os resultados das nossas experiencias estão condensados na Tabela 1. Pela comparação do teor antitoxico alcançado anteriormente e os obtidos com o antigeno e lanolina mais oleo de oliva, nota-se uma nitida melhora dos titulos antitoxicos. Assim é que, dos 24 cavalos reimunizados, 19 alcançaram um titulo maximo bastante aumentado, 3 conservaram o mesmo teor de antitoxina que apresentavam anteriormente e 2 apresentaram antitoxina em titulo inferior. O aumento global do titulo antitoxico correspondente é cerca de 100% do apresentado anteriormente pelos mesmos animais. Este extraordinario aumento porcentual na realidade, é ainda maior, pois como demonstramos em trabalho anterior, nas condições habituais os cavalos retomados em nosso serviço apresentam uma diminuição de cerca de 30 %. Considerando ainda o fato de que o grupo de cavalos experimentados é composto de animais com pequena capacidade pro-

dutora de anticorpos, mais significativo se torna o aumento verificado. Queremos assinalar nossas observações sobre o estado geral dos animais imunizados nas condições referidas. Os pesos dos animais utilizados vêm expressos na Tabela 2. Nota-se que na imunização comum a maioria dos animais aumentou de peso durante a imunização, acontecendo o inverso e em grau mais acentuado quando se incorpora lanolina mais oleo ao antigeno. Por outro lado os abcessos com tendencia à necrose deixam o animal em estado fisico deploravel. A maioria dos animais alcança somente a primeira sangria, sendo necessario sangria a branco. Neste particular, estamos de acordo com Mme. Nenchiloff quando diz que em virtude das infiltrações extensas que persistem no ponto da injeção do antigeno englobado em lanolina e que conduzem algumas vezes a abcessos e necrose, não recomenda o emprego da lanolina como antigeno para uma aplicação geral. Este ponto de vista não se aplica nas particulares condições locais de produção de antitoxina difterica. Como tivemos oportunidade de expor em trabalho anterior, preconizamos como medida economica de produção a sangria a branco dos animais quando atingirem titulos antitoxicos satisfatorios; deste modo as reações locais muito extensas e o precario estado geral dos animais inoculados não entram em linha de conta.

RESUMO E CONCLUSÕES

O A. verifica os bons resultados que se obtem pelo processo de Ramon (antigeno incorporado à lanolina) na imunização de cavalos para a produção de antitoxina difterica.

O aumento verificado em um lote de 24 animais foi de cerca de 100 %.

O A. sugere que, nas condições gerais locais, este processo de imunização combinado com a sangria a branco é o mais eficiente e economico.

ABSTRACT

The author verifies the excellent result obtained by Ramon's process (antigens incorporated in the lanoline) in the immunization of horses for production of diphtheric antitoxin.

The increase stated in one lot was of about 100 %.

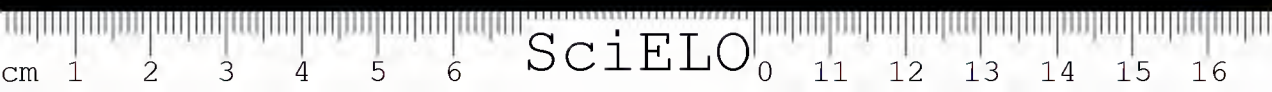
The author suggests that, in the common local conditions, this immunization process combined with the total bleeding might be the most accurate and economic.

BIBLIOGRAFIA

1. *Ramon, G.* — Ann. Inst. Pasteur **40**:1.1926.
2. *Ramon, G.* — Ann. Inst. Pasteur **47**:339.1931.

3. *Ramon, G. & Lemetayer, E.* — C. R. Soc. Biologie 119:248.1935.
4. *Ramon, G. & Lemetayer, E.* — J. Immunology 22:125.1932.
5. *Ramon, G.; Richou, R. & Lemetayer, E.* — C. R. Soc. Biologie 116:823.1934.
6. *Ramon, G.; Lemetayer, E. & Richou, R.* — Revue d'Immunologie 1:199.1935.
7. *Thibalt, P. & Richou, R.* — C. R. Soc. Biologie 121:718.1931.
8. *Weinberg, M. & Guillaumie,* — La Presse Médicale 54:1090.1935.
9. *Ramon, G.* — Bull. Inst. Pasteur 36:695.1938.
10. *Weinberg, M. & Kreguer, A.* — C. R. Soc. Biologie 128:949.1938.
11. *Ramon, G.; Lemetayer, E. & Richou, R.* — C. R. Soc. Biologie 115:2027.1934.
12. *Ramon, G. & Lemetayer, E.* — C. R. Soc. Biologie 119:248.1935.
13. *Pagniles,* — C. R. Soc. Biologie 122:647.1936.
14. *Menchiloff, N. A.* — Revue d'Immunologie 3:557.1937.

(Trabalho da Secção de Immunologia do Instituto Butantan. Recebido em novembro de 1938 e dado à publicidade em junho de 1939).

616.245

AÇÃO DA VITAMINA C (ACIDO 1-ASCORBICO) SOBRE AS TOXINAS DA GANGRENA GAZOSA

POR

A. BÜLLER SOUTO & C. LIMA

INTRODUÇÃO

A gangrena gazosa é essencialmente uma toxemia. Em sua patogenese, a resistencia organica individual desempenha um papel capital.

E' bem conhecida a influencia da vitamina C sobre a resistencia organica, bem como suas propriedades neutralizantes sobre as toxinas e poder de inativação sobre o virus. A ação da vitamina C sobre a toxina difterica foi observada por Harde (1) que atribui àquela substancia o poder de neutralizar a toxina *in vitro* e, *in vivo*, fixal-a *in loco*, protegendo desta maneira o organismo. Harde e Philippe (2) encontraram certo poder antigenico das misturas de toxina neutralizada pela vitamina C; este poder antigenico seria ligado não somente à capacidade oxi-redutora, como ao poder estimulante da produção de adrenalina pelo organismo. Harde e Greenwall (3) acharam que a vitamina C aumenta a resistencia das cobaias contra 1 D. M. M. de toxina difterica padrão, tornando menos toxicos os solutos de toxinas e não destruindo as propriedades anti-toxicas da anti-toxina difterica. Jungeblut e Zwemer (4) concluiram que a vitamina C *in vitro* inativa a toxina difterica; *in vivo*, pequenas dóses preventivas tornariam as cobaias temporariamente resistentes ou menos sensiveis a pequenas dóses de toxina, o que se póde apreciar pelas provas intracutaneas. Grooten e Bezssonoff (5) puderam demonstrar que a vitamina C, após neutralização quimica (pH), injetadas em cobaias simultaneamente com a toxina difterica, lhes aumenta a resistencia à intoxicação contra fraca quantidade desta toxina; não puderam, porém, demonstrar a ação direta sobre ela acreditando antes que a vitamina C estimula certas reações do organismo, as quais aumentam a resistencia á intoxicação. Zilva (6) não encontrou ação protetora *in vivo* da vitamina C sobre a intoxicação difterica. Sobre a toxina tetanica, Jungeblut (7) observou notavel poder incenti-

vante da vitamina C, não tendo, porém, conseguido demonstrar a ação protetora. A ação da vitamina C (acido 1-arcorbico) sobre esta toxina foi estudada por Schulze e Hecht (8), que lhe observaram tambem, e simultaneamente com Diechoff (9) a ação sobre a anatoxina difterica. A ação antivirulenta ou virucida da vitamina C foi verificada sobre os virus da poliomielite, da encefalite, do mosaico e do herpes.

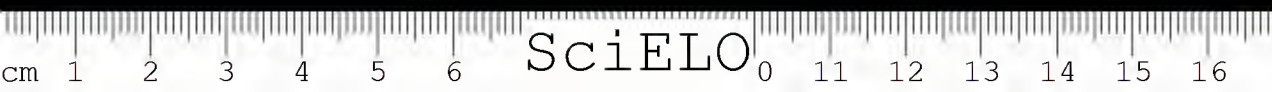
O aspecto pratico desse estudo estaria no seguinte: é sabido que o organismo da criança necessita de uma "dóse quotidiana minima" de 0,003 gs. de acido 1-ascorbico, ou sejam 60 unidades internacionais, ao passo que um adulto necessita da "dóse quotidiana minima" de 0,009 gs. ou sejam 180 unidades. No periodo de paz essas "dóses quotidianas minimas" são facilmente obtidas na ração alimentar, nos periodos de guerra o mesmo não se dá, resultando das deficiencias nutritivas tão comuns durante os mesmos, todos os gráus de carencia vitaminica que explicam, talvez, a insolita frequencia e a gravidade então manifestada pelas infecções gangrenosas. Ela é segundo Aperlo (1) um: "processo che ha il triste privilegio di comparire ogni volta che una guerra piu o meno lunga ed atroce viene impegnata da popoli fra loro belligeranti e, solo rarissimamente in tempo di quiete e di pace insorge a minaciare l'esistenza di qualche ferito accidentale".

"Eppure la gangrene gassosa costituisce l'affezione piú commune e terribilie che minacci la vita dei feriti di guerra e quali sempre essa aggredische e, se tavolta no uccide, molto apesso tragicamente munifica delle piú estese e deturpanti mutilazione".

Por isso e tendo em vista a literatura acima referida, resolvemos investigar a ação da vitamina C (acido 1-ascorbico) sobre as toxinas gangrenosas. No presente trabalho descreveremos uma serie de verificações que fizemos sobre a ação preventiva, curativa in vivo e neutralizante in vitro, da vitamina C sobre as toxinas do Cl. welchii, Cl. oedematimaligni (vibrion septique), Cl. oedematiens e do Cl. histolyticum.

AÇÃO DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO CLOSTRIDIUM WELCHII

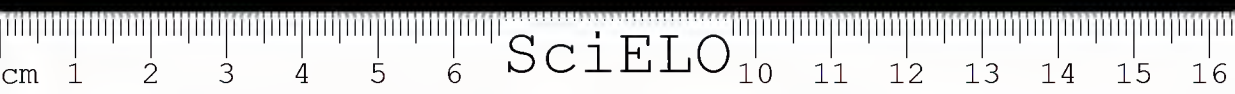
Tecnica

Toxina utilizada — Toxina seca, preparada pela precipitação, por meio de sulfato de amonio, do filtrado isento de germes; proveniente de uma cultura de 18 a 20 horas a 37° C. O sobrenadante era recolhido e seco em baixa temperatura, em vacuo sulfurico e, depois, sobre anidrido fosforico até peso constante. A dóse minima letal da toxina era de 0,0004.

Vitamina C — A vitamina (acido l-ascorbico) foi-nos fornecida pela Casa Bayer, a quem agradecemos. Usamos um soluto de vitamina C, que continha 50 miligramas por cc. e com pH 6,6 (∓ 0,1).

Animais de prova — Usamos camondongos, que, além de serem os animais sensiveis recomendados pela Comissão Permanente de Padronização Biologica da Liga das Nações (10) para doseamento das toxinas *welchii* (em vista da sua capacidade uniforme de sintetizar a vitamina), nos poderiam fornecer resultados mais constantes. Foram utilizados 4 lotes, tão padronizados quanto possivel, e em geral da mesma idade com peso variante entre 17 a 20 gs..

Como a D. M. L. das toxinas gangrenosas é aquela que mata alguns, mas não todos os camondongos inoculados, foi necessario utilizar sempre lotes muito numerosos. Só com um lote de 70 animais é que conseguimos determinar a D. M. L.. Com um segundo lote de 168 camondongos, determinamos a ação preventiva; com um lote de 152, determinamos a ação curativa; e, com um de 118, determinamos a ação neutralizante. As inoculações da toxina *welchii* foram feitas por via venosa. As injeções da vitamina C o foram por via muscular, excéto nas experiencias sobre a ação neutralizante. Nestas, injetamos por via venosa as misturas de vitamina C e toxina *welchii*. A cada serie de pesquizas corresponderam testemunhos paralelos.

Foram feitos ensaios preliminares afim de verificar: 1.°, si a toxina suportava bem a diluição em salina de pH 6,6 (± 0,1), pois este era o pH da diluição da vitamina C; 2.°, si dóses de 25 mgs. de vitamina C eram bem suportadas pelos camondongos e pela via venosa, não obstante as experiencias de Rohmer, Bezssonoff, Stoer- e Perrier (11) já terem provado que os mamiferos suportam dóses massiças de vitamina C; 3.°, si os solutos de toxina continham cobre, pois, conforme Barron, De Meio e Klemperer (12), este metal é catalizador da oxidação do acido ascorbico, exercendo ação em concentração de 46 microgramas. Esta pesquiza do cobre adquiria grande importancia, porque nossas diluições foram feitas em salina fisiologica. Conforme Mawson (13), Kellie e Zilva (14), "The oxydation catalysed by Cu was very much slower when NaCl present", embora Barron, De Meio e Klemperer não tivessem podido notar este efeito inibitorio do cloreto de sodio sobre a autoxidação da vitamina C. E sobretudo porque o cobre, além de oxidar a vitamina C, conduz á formação de peroxido de hidrogenio (15), cuja ação sobre as toxinas anaerobias é sobejamente conhecida.

As rigorosas analises dos solutos das toxinas, realizadas na secção de Quimica pelo nosso colega, Carlos Slotta, mostraram que os solutos estavam praticamente livres de cobre. Slotta empregou "o metodo indicado por Fischer, que consiste em adicionar na concavidade de uma placa de Tuppel, para cada 3 gotas de soluto, 3 gotas de um soluto de 1 mgs. de difeniltiocarbazona em 10 cs.

de tetracloreto de carbono. Segundo Feigl (Qualitative Analyse mit Hilfe von Tüpfelreaktionen, Leipzig 1935, 175), dá-se a viragem do soluto reagente para o amarelo castanho ainda com a presença de 0,2 gamas de cobre".

AÇÃO PREVENTIVA

Um lote de 168 camondongos foi utilizado: 112 animais receberam, durante 3 dias, 10 miligramas de vitamina C por via muscular; este lote foi repartido em 2, um de 55 animais, que receberam 1 D.M.L. de toxina e outro de 50 animais, que receberam 2 D.M.L. Como testemunhos foram utilizados 56 camondongos, dos quais 26 receberam 1 D. M. L. e 30, 2 D. M. L..

Os resultados obtidos estão resumidos no quadro I e grafico I.

QUADRO I

AÇÃO PREVENTIVA DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO **CL. WELCHII**:

VITAMINA C						Toxina	ANIMAIS				
Intervalos das inoculações			*Doses*			*Doses*	*Inoculados*	*Mortos em 24 hs.*	*Sobreviventes % em 24 hs.*	*Mortos em 48 hs.*	*Sobreviventes % em 48 hs.*
24 hs.	24 hs.	24 hs.	10 mgs.	10 mgs.	10 mgs.	1 D.M.L.	55	11/55	80%	14/55	74%
			10 mgs.	10 mgs.	10 mgs.	3 D.M.L.	57	35/57	38,5%	33/57	33,3%
				T		1 D.M.L.	26	11/26	57,6%	13/26	50%
				1		2 D.M.L.	30	30/30	0%	30/30	0%

NOTA — Não houve alteração após 48 horas de observação.

AÇÃO CURATIVA

Procuramos verificar: 1.º, qual o periodo maximo em que a vitamina C poderia exercer sua atividade contra 1 e 2 D.M.L. de toxina do *Cl. welchii*; 2.º, si dóses de 10 mgs., repetidas com intervalo de 1 e 3 horas, teriam ação curativa maior do que dóses unicas. Para esse fim, 152 animais foram divididos em 5 lotes: o primeiro lote, de 30 animais, que foi subdividido em 2 outros de 15 animais, que receberam, respectivamente, 1 D. M. L. e 2 D. M. L., sendo a vitamina C dada, uma hora depois, a cada animal, na dóse de 25 mgs. (grafico II).

2.º, o lote de 29 animais foi tambem subdividido em 2 outros, respectivamente, de 15 e 14 animais, dos quais um recebeu 1 D.M.L., e o outro, 2 D.M.L. e, 2 horas depois, 25 mgs. de vitamina C (grafico III).

GRAFICO I

100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0

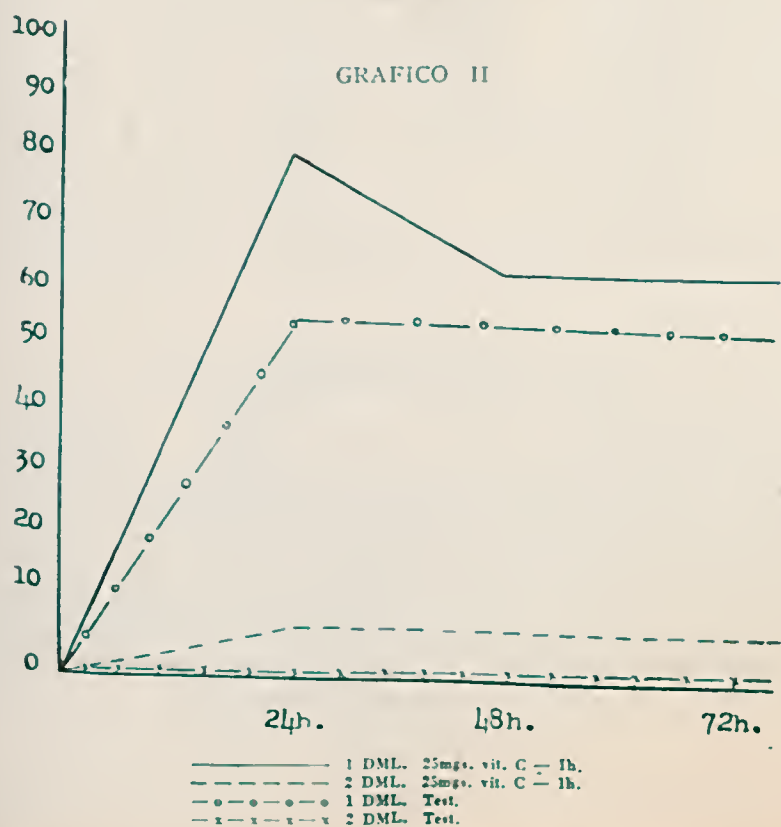
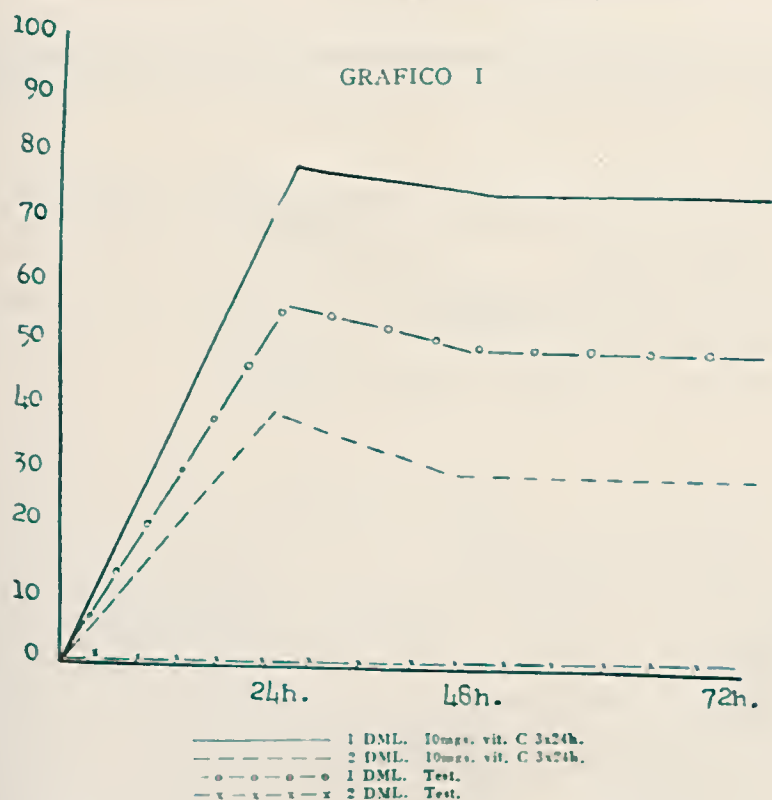
24h. 48h. 72h.

———————	1 DML. 10mgs. vit. C 3x24h.
— — — — — —	2 DML. 10mgs. vit. C 3x24h.
-o—o—o—o	1 DML. Test.
—x—x—x—x	2 DML. Test.

GRAFICO II

100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0

24h. 48h. 72h.

———————	1 DML. 25mgs. vit. C — 1h.
— — — — — —	2 DML. 25mgs. vit. C — 1h.
—o—o—o—o	1 DML. Test.
—x—x—x—x	2 DML. Test.

O 3.º lote, de 32 animais, exatamente como os primeiros, recebeu, respectivamente, 1 e 2 D.M.L. de toxina e, 3 horas depois, 25 mgs. de vitamina C (grafico IV).

O 4.º lote recebeu, 1 e 3 horas depois da inoculação respectiva de 1 e 2 D.M.L. de toxina, 2 dóses de 10 mgs. de vitamina C (grafico V).

O 5.º lote, testemunho, recebeu sómente, respectivamente, 1 e 2 D.M.L. de toxina.

Os resultados obtidos estão resumidos no quadro II.

QUADRO II

AÇÃO CURATIVA DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO **CL. WELCHII**

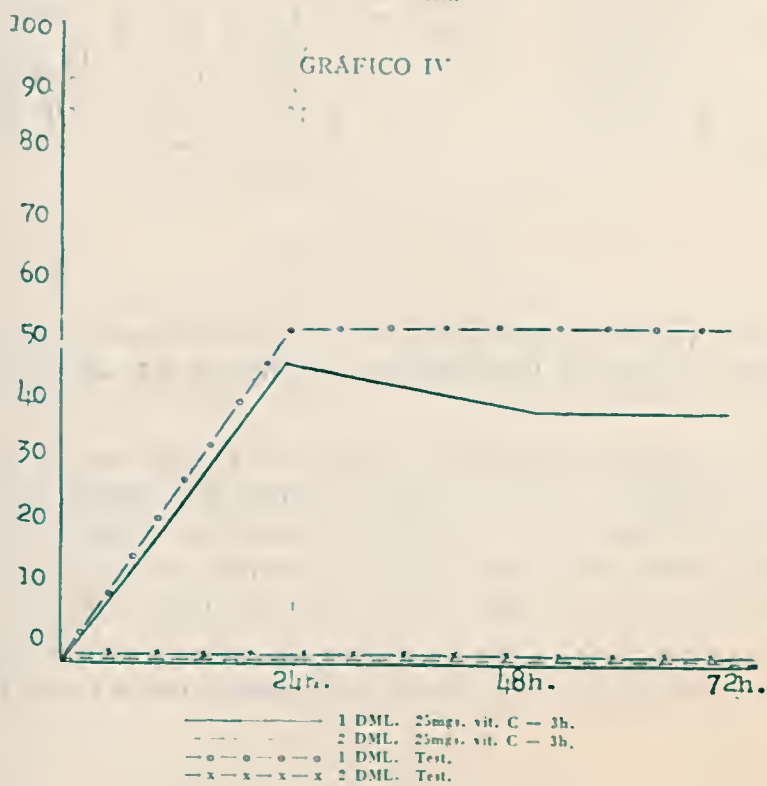
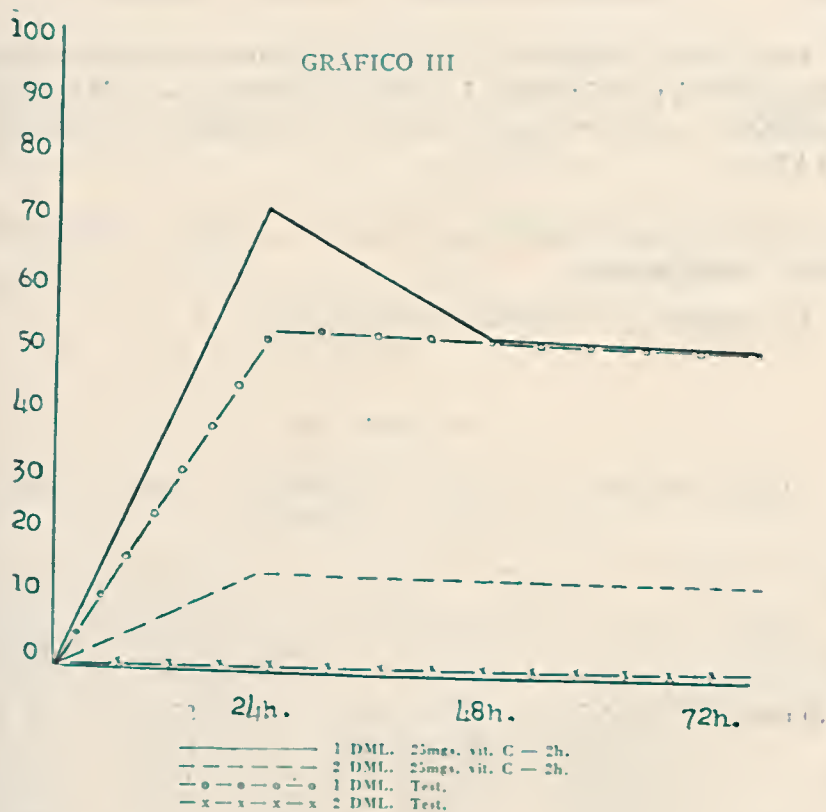
Intervallos Inoc. Toxina: Inoc. vit. C	Toxina Doses	Vitamina C Doses	ANIMAIS				
			Inoculados	Mortos 24 hs.	Sobreviventes % em 24 hs.	Mortos em 48 hs.	Sobreviventes % em 48 hs.
1 hora	1 D.M.L.	25 mgs.	15	3/15	80 %	5/15	66,6%
1 hora	2 D.M.L.	25 mgs.	15	14/15	6,6%	14/15	6,6%
2 horas	1 D.M.L.	25 mgs.	15	4/15	73,3%	7/15	53,3%
2 horas	2 D.M.L.	25 mgs.	15	12/14	14,2%	12/14	14,2%
3 horas	1 D.M.L.	25 mgs.	15	8/15	46,6%	9/15	40,0%
	2 D.M.L.	25 mgs.	16	15/15	0,0%	15/15	0,0%
1 e 3 horas	1 D.M.L.	10 10 mgs.	15	4/16	75 %	4/16	75 %
	2 D.M.L.	10 10 mgs.	16	16/16	0 %	16/16	0 %
	1 D.M.L.	T	15	7/15	53,3%	7/15	53,3%
	2 D.M.L.	T	15	15/15	0,0%	15/15	0,0%

NOTA — Não houve alteração após 48 horas de observação.

AÇÃO NEUTRALIZANTE **in vitro**

Procuramos verificar *in vitro*: 1.º, si a vitamina C neutralizava a toxina *welchii*; 2.º, si a neutralização obedecia à lei das proporções multiplas; 3.º, si o tempo de contato exercia influencia na neutralização.

Para esse fim, foram deixadas quantidades de 1 D.M.L. em contacto, na temperatura de 30º C, durante 30 minutos com 10 e 25 mgs. de vitamina C, sendo inoculadas em 15 e 13 camondongos, respectivamente; igualmente 2 D.M.L. postas em contacto, na temperatura de 30º C, por 30 minutos com 10 e 25 mgs., foram inoculados em 2 lotes de 15 camondongos (grafico VI).

GRÁFICO III
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24h.
48h.
72h.
1 DML. 25mgs. vit. C — 2h.
2 DML. 25mgs. vit. C — 2h.
1 DML. Test.
2 DML. Test.
GRÁFICO IV
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24h.
48h.
72h.
1 DML. 25mgs. vit. C — 3h.
2 DML. 25mgs. vit. C — 3h.
1 DML. Test.
2 DML. Test.

Outra série de experiencias foi realizada deixando-se em contacto, na temperatura de 30° C, por 60 minutos 1 D.M.L. com 10 mgs. e 2 D. M.L. com 25 mgs. de vitamina C, sendo inoculados 2 lotes de 15 camondongos com cada dóse (grafico VII).

30 camondongos testemunhos em 2 lotes de 15 foram inoculados com 1 e 2 D.M.L., respectivamente.

Os resultados estão resumidos no quadro III.

QUADRO III

AÇÃO NEUTRALIZANTE DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO **CL. WELCHII**

Tempo de contacto	Toxina Doses	Vitamina C. Doses	ANIMAIS Inoculados	Mortos em 24 hs.	Sobreviventes % 24 hs.	Mortos em 48 hs.	Sobreviventes % em 48 hs.
30 minutos	1 D.M.L.	10 mgs.	15	7/15	53,3%	9/15	40 %
	1 D.M.L.	25 mgs.	13	7/13	46,1%	9/13	30,7%
	2 D.M.L.	10 mgs.	15	13/15	13,3%	14/15	6,6%
	2 D.M.L.	25 mgs.	15	15/15	0,0%	15/15	0.0%
60 minutos	1 D.M.L.	10 mgs.	15	9/15	40 %	10/15	33,3%
	2 D.M.L.	25 mgs.	15	15/15	0 %	15/15	0 %
	1 D.M.L.	T	15	7/15	53,3%	7/15	53,3%
	2 D.M.L.	T	15	15/15	0 %	15/15	0 %

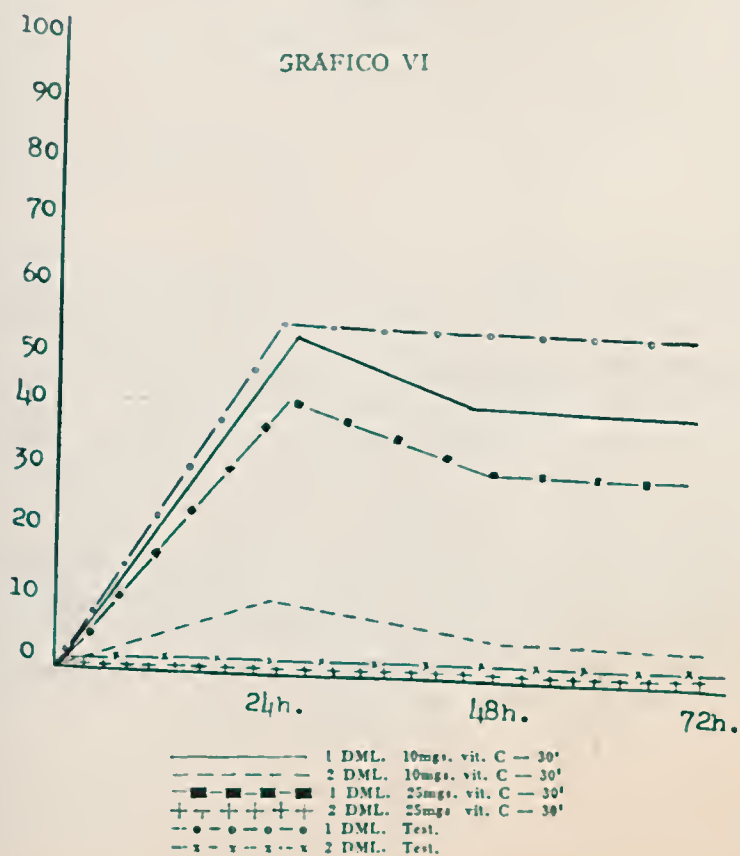
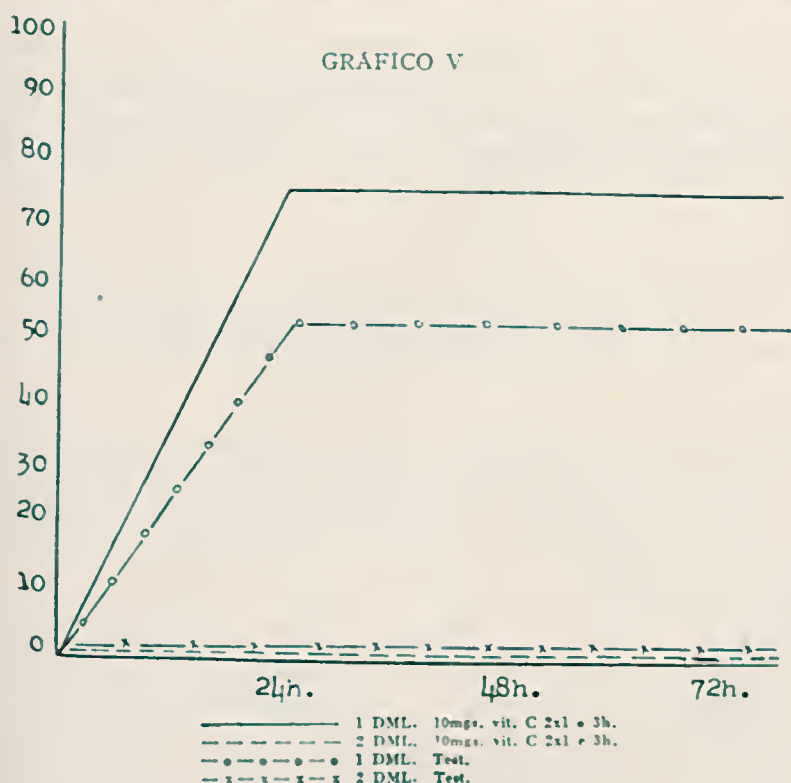
NOTA — Não houve alteração após 48 horas de observação.

CONCLUSÕES

1.ª — A vitamina C (acido 1-ascorbico) parece incrementar a resistencia organica do camondongo, tornando-o mais resistente á ação da toxina do *Cl. welchii*.

2.ª — A vitamina C (acido 1-ascorbico) exerce ação curativa até 1 hora depois de inoculada a toxina *welchii*, não tendo ação quando a toxina é inoculada 2 e 3 horas antes. A vitamina C em dóses repetidas de 10 mgs. 1 e 3 horas depois de inoculada 1 D.M.L., tem ação curativa mais nitida do que em dóses unicas de 25 mgs., porém, é sem ação contra 2 M. D. L..

3.ª — A vitamina C (acido 1-ascorbico) não demonstrou exercer ação neutralizante *in vitro* mesmo após contacto de 60 minutos com a toxina, parecendo

GRÁFICO V
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24h.
48h.
72h.
1 DML. 10mgs. vit. C 2x1 e 3h.
2 DML. 10mgs. vit. C 2x1 e 3h.
1 DML. Test.
2 DML. Test.
GRÁFICO VI
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24h.
48h.
72h.
1 DML. 10mgs. vit. C — 30'
2 DML. 10mgs. vit. C — 30'
1 DML. 25mgs. vit. C — 30'
2 DML. 25mgs vit. C — 30'
1 DML. Test.
2 DML. Test.

sensibilizar o organismo do animal ás misturas de toxina-vitamina ou dar em contacto com a toxina do *Cl. welchii*, produtor de degradação mais toxicos para o camondongo do que a toxina só. A intensidade da ação toxica destes produtos é diretamente proporcional: ao tempo de contacto das misturas: toxina-vitamina e a quantidade de vitamina utilizada.

AÇÃO DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO **CLOSTRIDIUM OEDEMATIS MALIGNI** (*VIBRIÃO-SEPTICO*)

Toxina utilizada — Toxina seca preparada por precipitação por meio do sulfato de amonio, do filtrado isento de germes provenientes de cultura de 48 horas a 37° C.. O precipitado era recolhido a seco a baixa temperatura em vacuo sulfurico e depois sobre anidrido fosforico até peso constante. A D.M.L. desta toxina era 0,00005.

Vitamina C — Usamos a vitamina C (acido l-ascorbico) quimicamente puro, na diluição de 50 mgs. por c.c. com pH 6,6 (± 0,1). Esse produto foi-nos fornecido pela Casa Bayer, a quem agradecemos a gentileza.

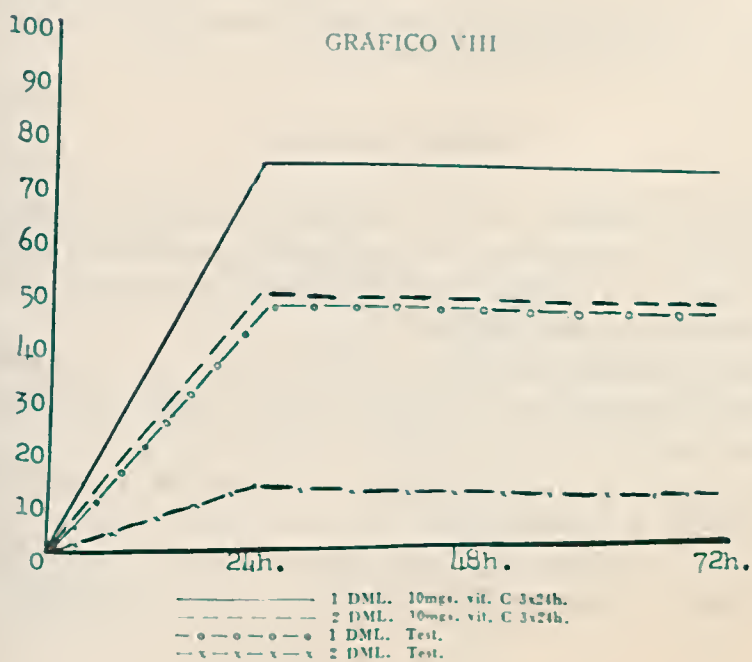
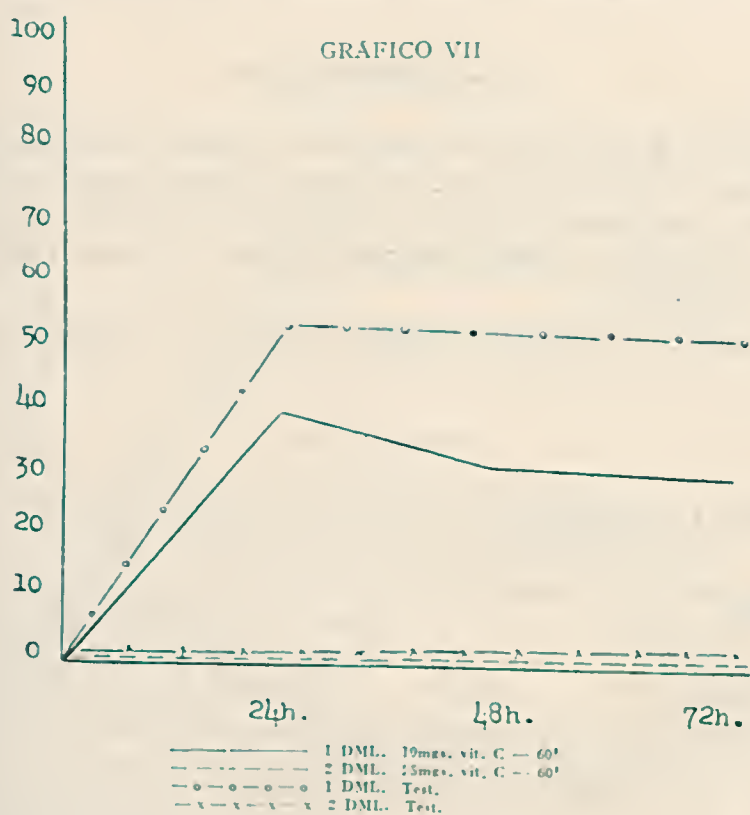
Animais de prova — O camondongo, que é o animal sensivel, utilizado nos doseamentos das toxinas, conforme as recomendações do C. de Padronização Biologica da Liga das Nações (16), e pelo National Institute of Health (17), foi tambem preferido pelas nossas pesquizas atuais. Usamos 4 lotes tão padronizados quanto possivel, em geral com a mesma idade, com peso variando de 17 a 20 gs.. As DD. MM. LL., sendo por definição aquelas que matam alguns, mas não todos os camondongos injetados, exigiram sempre lotes mais ou menos numerosos.

Com um lote de 50 animais fixamos a D.M.L.; com outro de 83 animais determinamos a ação preventiva e, com 2 lotes de 62 animais, estudamos, respectivamente, a ação curativa e a neutralizante. As inoculações da toxina do vibrião septico foram feitas por via venosa. Excéto nas experiencias sobre a ação neutralizante, em que injetamos as misturas de vitaminas C e toxina vibrião septico por via venosa, nas demais a vitamina C foi injetada pela via muscular.

A cada serie de pesquisas corresponderam testemunhos paralelos.

Experiencias preliminares demonstraram: 1.°, que a toxina não era afetada quando diluida em liquido com pH 6,6 (± 0,1); 2.°, que a vitamina C, em dóses de 25 mgs. por via venosa e muscular, não tinha efeito nocivo sobre a vida dos camondongos; 3.°, que as nossas diluições de toxina do vibrão septico não tinham cobre em dóse maior do que 0,2 gamas, conforme as analises realizadas na secção de Quimica pelo nosso colega Carlos Slotta.

GRÁFICO VII
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24h.
48h.
72h.
1 DML. 10mgs. vit. C — 60'
2 DML. 25mgs. vit. C — 60'
1 DML. Test.
2 DML. Test.

GRÁFICO VIII
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24h.
48h.
72h.
1 DML. 10mgs. vit. C 3x24h.
2 DML. 10mgs. vit. C 3x24h.
1 DML. Test.
2 DML. Test.

AÇÃO PREVENTIVA

Utilizamos um lote de 83 camondongos, dos quais 61 foram injetados, durante 3 dias seguidos, com 10 mgs. de vitamina C por via muscular. Este lote foi dividido em 2 partes: 30 receberam 1 D.M.L. e 31 receberam 2 D.M.L. de toxina vibrião septico. Como testemunho, 10 animais, receberam 1 D.M.L. e 12 receberam 2 D.M.L.

Os resultados obtidos estão resumidos no quadro IV e grafico VIII.

QUADRO IV

AÇÃO PREVENTIVA DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO **CL. OEDEMATIS MALIGNI** (*VIBRIAO-SEPTICO*)

VITAMINA C						ANIMAIS					
Intervalos das inoculações			Doses			Toxina Doses	Inoculados	Mortos em 24 hs.	Sobreviventes % em 24 hs.	Mortos em 48 hs.	Sobreviventes % em 48 hs.
24 hs.	24 hs.	24 hs.	10 mgs. 10 mgs.	10 mgs. 10 mgs.	10 mgs. 10 mgs.	1 D.M.L. 2 M.D.L. 1 D.M.L. 2 D.M.L.	30 31 10 12	7/30 15/31 5/10 10/12	76,6% 51,7% 50% 16,6%	7/30 15/31 5/10 10/12	76,6% 51,7% 50% 16,6%

NOTA — Não houve alteração após 48 horas de observação.

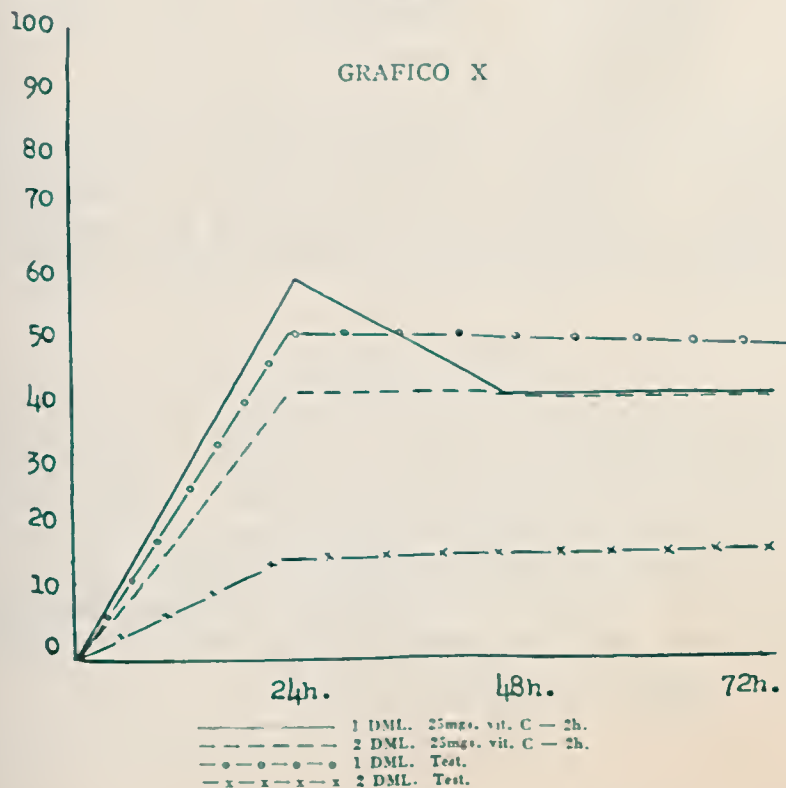
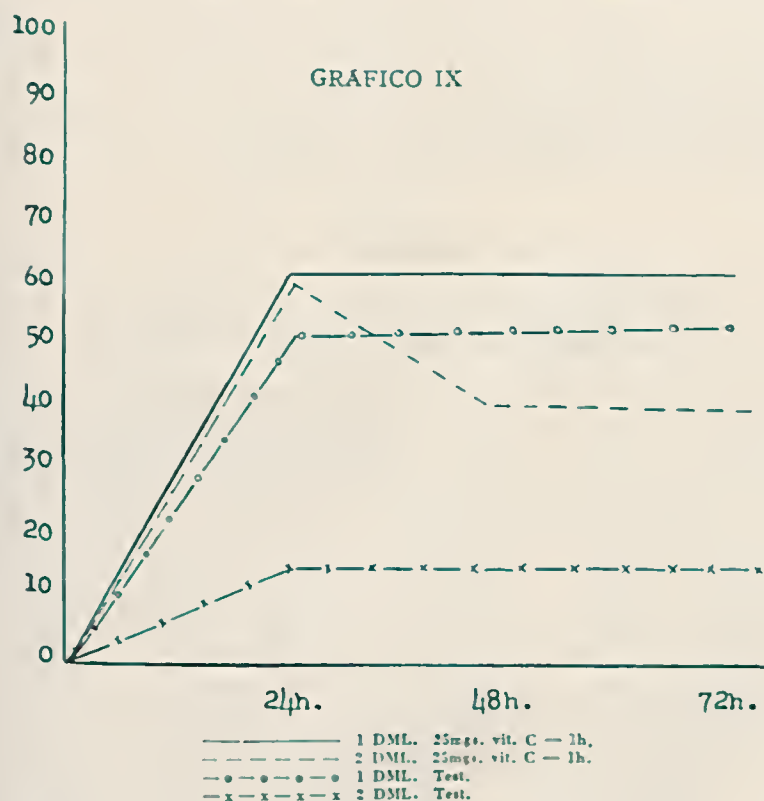
AÇÃO CURATIVA

Procuramos verificar: 1.°, si a vitamina C tinha ação curativa contra a toxina do *Cl. oedematis maligni;* 2.°, qual o espaço maximo em que se exerceria esta ação; 3.°, si dóses repetidas de 10 mgs. de vitamina C teriam ação curativa maior de que dóses unicas.

Um lote de 62 camondongos foi subdividido em 5 outros: no primeiro, os animais foram inoculados com 1 D.M.L. e 2 D.M.L., recebendo, 1 hora depois, 25 mgs. de vitamina C (grafico IX).

No segundo lote foram inoculadas 1 e 2 D.M.L. e, 2 horas depois, 25 mgs. de vitamina C (grafico X).

No terceiro lote foram inoculadas 1 e 2 D.M.L. e 5 horas depois, 25 mgs. de vitamina C (grafico XI).

GRAFICO IX
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24h.
48h.
72h.
1 DML. 25mgs. vit. C — 1h.
2 DML. 25mgs. vit. C — 1h.
1 DML. Test.
2 DML. Test.
GRAFICO X
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24h.
48h.
72h.
1 DML. 25mgs. vit. C — 2h.
2 DML. 25mgs. vit. C — 2h.
1 DML. Test.
2 DML. Test.

No quarto, injetado com 1 e 2 D.M.L., foram dados, com intervalos de 1 e 3 horas, 10 mgs. de vitamina C (grafico XII).

No quinto lote foram injetados 1 e 2 D.M.L., servindo como testemunho. Os resultados obtidos estão resumidos no quadro V.

QUADRO V

AÇÃO CURATIVA DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO **CL. OEDEMATIS MALIGNI** (*VIBRIÃO SEPTICO*)

Intervallos Inc. tox. gangr.; Inc. vit. C.	Toxina Doses	Vitamina C Doses	ANIMAIS				
			Inoculados	Mortos em 24 hs.	Sobreviventes % em 24 hs.	Mortos em 48 hs.	Sobreviventes % em 48 hs.
1 hora	1 D.M.L.	25 mgs.	5	2/5	60 %	2/5	60 %
1 hora	2 D.M.L.	25 mgs.	5	2/5	60 %	3/5	40 %
2 horas	1 D.M.L.	25 mgs.	5	2/5	60 %	3/5	40 %
2 horas	2 D.M.L.	25 mgs.	5	3/5	40 %	3/5	40 %
5 horas	1 D.M.L.	25 mgs.	5	1/5	80 %	2/5	60 %
5 horas	2 D.M.L.	25 mgs.	5	3/5	40 %	4/5	20 %
1 e 3 horas	1 D.M.L.	10—10 mgs.	5	0/5	100 %	0/5	100 %
1 e 3 horas	2 D.M.L.	10—10 mgs.	5	4/5	20 %	5/5	0 %
—	1 D.M.L.	—	10	5/10	50 %	5/10	50 %
—	2 D.M.L.	—	12	10/12	16,6%	10/12	16.6%

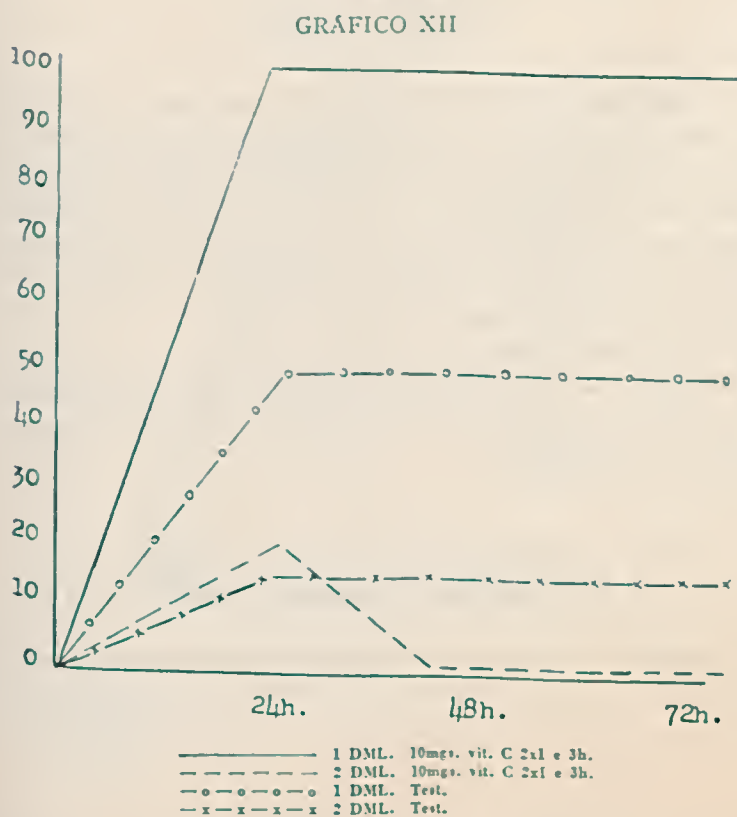
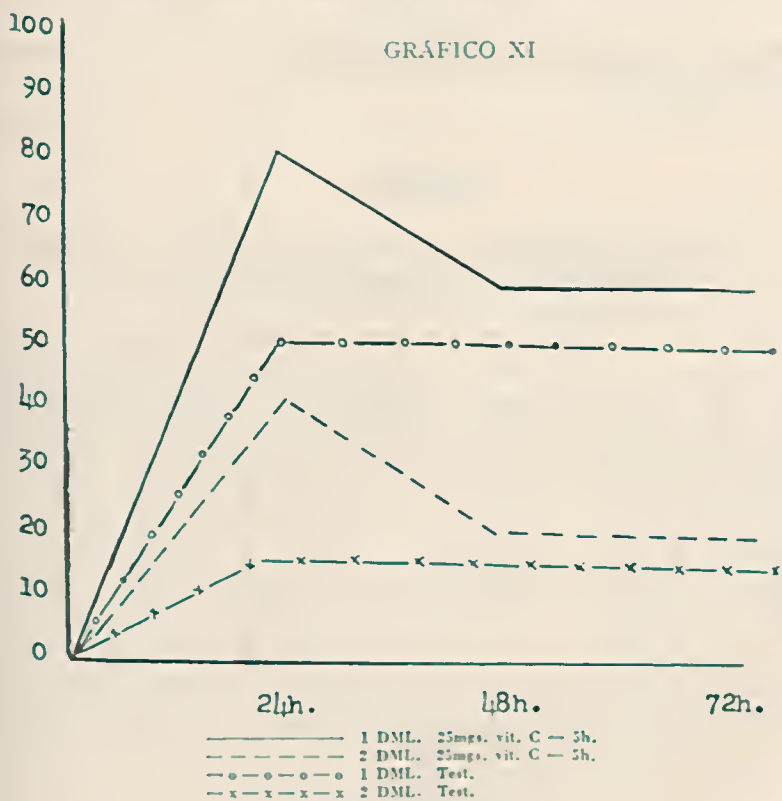
NOTA — Não houve alteração apos 48 horas de observação.

A desigualdade na ação antitoxica da vitamina C, que se notam nitidamente no quadro acima, já haviam sido registadas por Harde e Greenwald (3). e por Bezssonofi (5), nos seguintes termos que acentuou: "On remarquera que la même inégalité de l'action antitoxique de la vitamine s'est régulièrement manifesté au cours des experiences de Mlle Hard et de Greenwald et Mme. Harde".

AÇÃO NEUTRALIZANTE

Procuramos tambem aqui verificar si a vitamina C: 1.º, neutralizava a toxina do *Cl. oedematis maligni* (vibrião septico); 2.º, si o tempo de contacto exercia ação sobre o poder neutralizante da vitamina C. Da vitamina C doses de 10 a 25 mgs. foram deixadas em contacto 30 minutos a 30º C. com 1 e 2 D.M.L. de toxina do *Clostridium oedematis maligni* (grafico XIII).

Em outra serie de ensaios, 10 a 25 mgs. de vitamina C permanecem em contacto a 30º C., durante 60 minutos, respectivamente, com 1 e 2 D.M.L. de toxina do *Cl. oedematis maligni* (grafico XIV).

GRÁFICO XI
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24h.
48h.
72h.
1 DML. 25mgs. vit. C — 5h.
2 DML. 25mgs. vit. C — 5h.
1 DML. Test.
2 DML. Test.
GRÁFICO XII
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24h.
48h.
72h.
1 DML. 10mgs. vit. C 2x1 e 3h.
2 DML. 10mgs. vit. C 2x1 e 3h.
1 DML. Test.
2 DML. Test.

Todas as misturas foram injetadas pela via venosa. Os resultados estão resumidos no quadro VI.

QUADRO VI

AÇÃO NEUTRALIZANTE DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO **CL. OEDEMATIS MALIGNI** (*VIBRIÃO SEPTICO*)

Tempo de contacto	Toxina Doses	Vitamina C Doses	ANIMAIS				
			Inoculados	Mortos em 24 hs.	Sobreviventes % em 24 hs.	Mortos em 48 hs.	Sobreviventes % em 48 hs.
30 minutos	1 D.M.L.	10 mgs.	5	0/5	100 %	0/5	100 %
30 minutos	1 D.M.L.	25 mgs.	5	0/5	100 %	0/5	100 %
30 minutos	2 D.M.L.	10 mgs.	5	3/5	40 %	3/5	40 %
30 minutos	2 D.M.L.	25 mgs.	5	2/5	60 %	2/5	60 %
60 minutos	1 D.M.L.	10 mgs.	10	0/10	100 %	0/10	100 %
60 minutos	2 D.M.L.	25 mgs.	10	0/10	100 %	1/9	90 %
—	1 D.M.L.	—	10	4/10	60 %	4/10	60 %
—	2 D.M.L.	—	12	10/12	16,6%	10/12	16,6%

NOTA — Não houve alteração após 48 horas de observação.

CONCLUSÕES

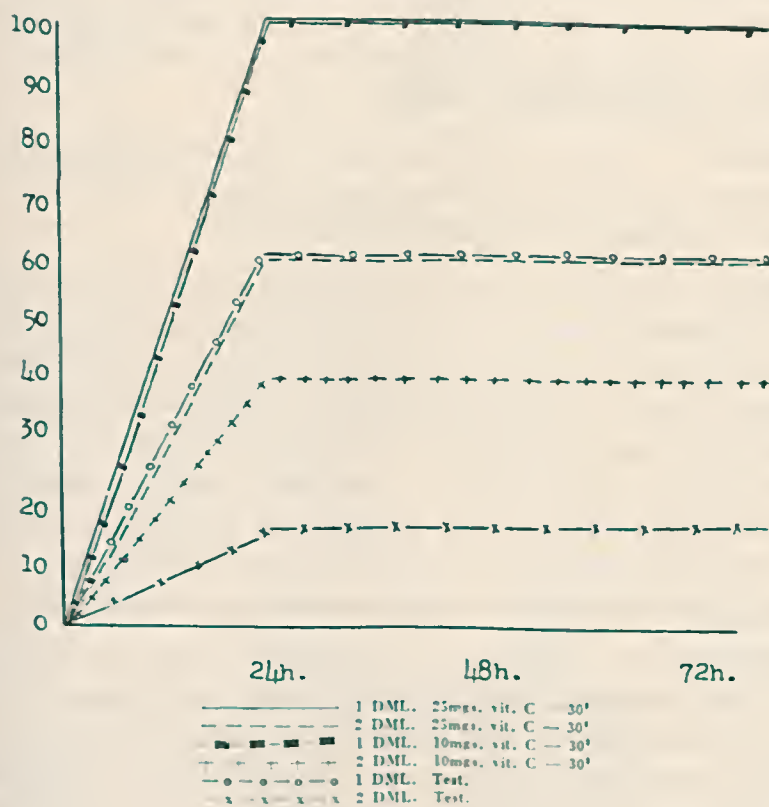
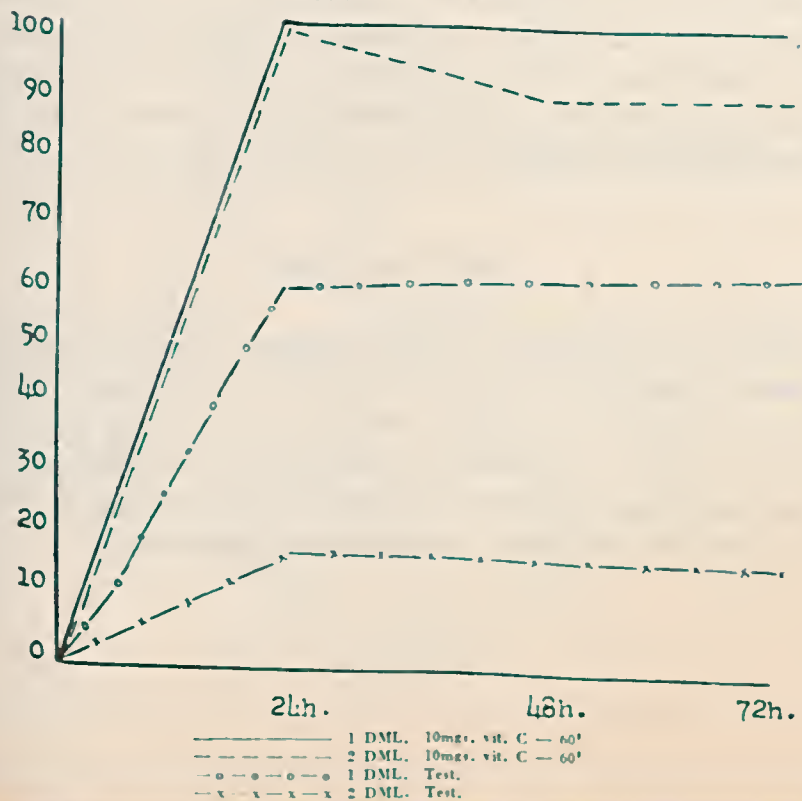
1.ª — A vitamina C (acido 1-ascorbico) parece tornar o camondongo mais resistente á ação da toxina de *Cl. oedematis maligni* (vibrião septico).

2.ª — A vitamina C (acido 1-ascorbico), até uma hora depois de inoculada a toxina tem ação curativa contra 1 e 2 D.M.L.; inoculada 2 horas depois da toxina, apresentou desigualdade de ação anti-toxica; dóses repetidas de 10 mgs. feitas e 1 e 3 horas depois da injeção de 1 D.M.L. de toxina de *Cl. oedematis maligni* protegem 100% dos animais inoculados.

3.ª — A vitamina parece ter ação neutralizante sobre a toxina de *Cl oedematis maligni*; essa ação neutralizante parece obedecer á lei das proporções multiplas; o tempo de contacto parece aumentar o poder neutralizante de vitamina C sobre a referida toxina.

AÇÃO DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO **CLOSTRIDIUM OEDEMATIENS**

Toxina utilizada — Toxina seca preparada pela precipitação por meio de sulfato de amonio em atmosfera inerte, do filtrado isento de germes; prove-

GRÁFICO XIII
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24h.
48h.
72h.
1 DML. 25mgs. vit. C — 30'
2 DML. 25mgs. vit. C — 30'
1 DML. 10mgs. vit. C — 30'
2 DML. 10mgs. vit. C — 30'
1 DML. Test.
2 DML. Test.
GRÁFICO XIV
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24h.
48h.
72h.
1 DML. 10mgs. vit. C — 60'
2 DML. 10mgs. vit. C — 60'
1 DML. Test.
2 DML. Test.

niente de cultura de 6 dias a 37° C. A toxina foi recolhida e seca em baixa temperatura sobre cloreto de calcio e depois sobre anidrido fosforico até peso constante. Triturada e tamisada foi conservada em ampolas fechadas no vacuo. A D.M.L. desta toxina era de 0,000242.

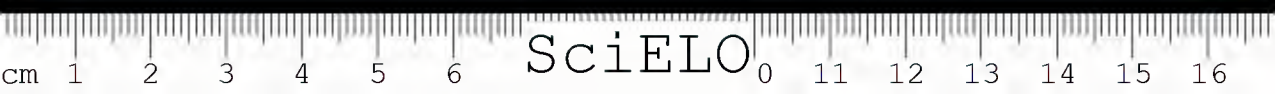
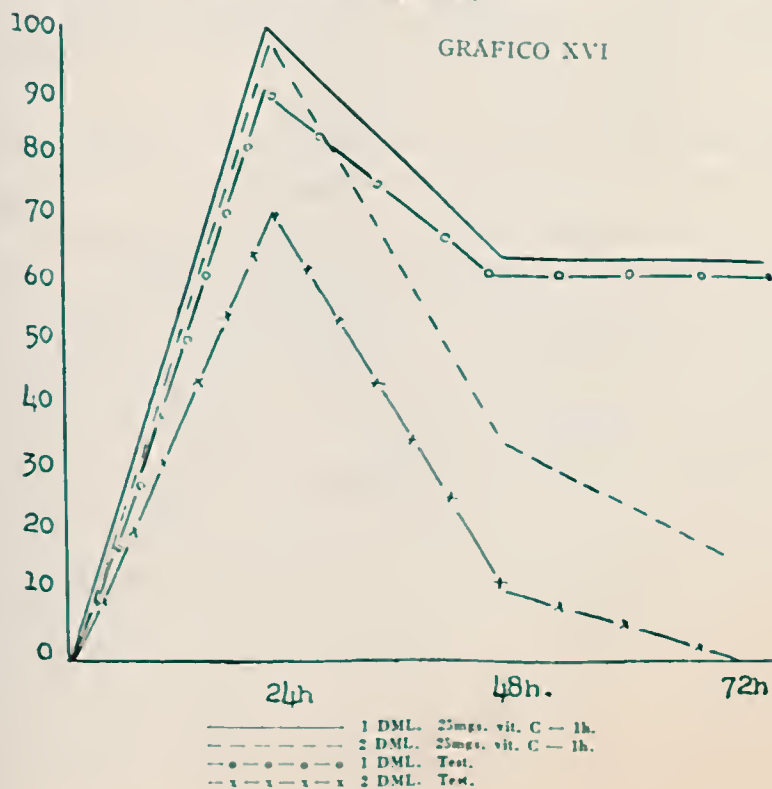
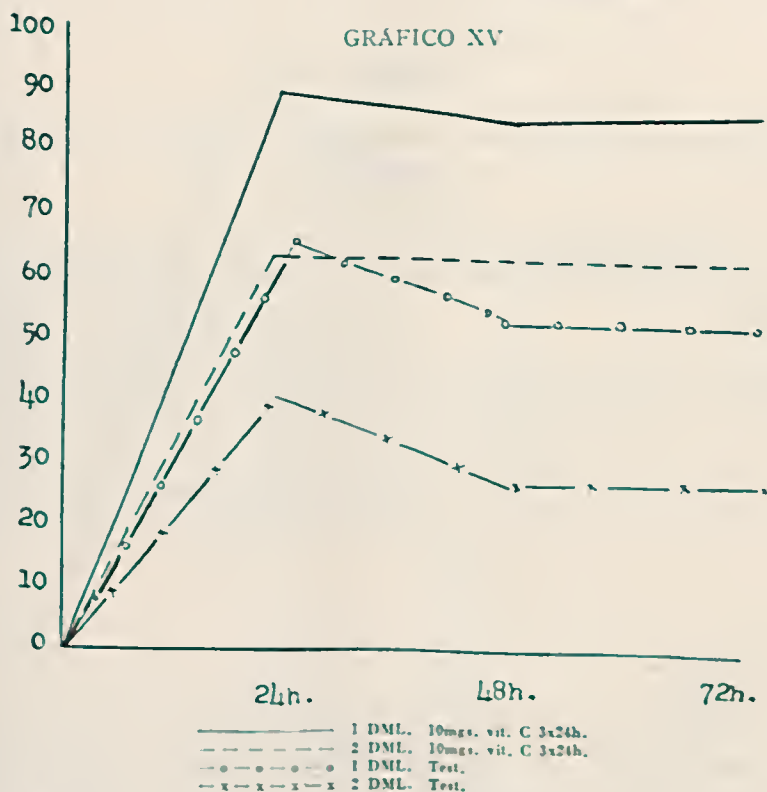
Vitamina C — Usamos vitamina C (acido l-ascorbico) quimicamente puro na diluição de 50 mgs. por centimetro cubico, com pH 6,6 (± 0,1). Agradecemos á Casa Bayer a gentileza de no-la ter fornecido.

Animais de próva — Adotamos camondongos, de acôrdo com as recomendações da Comissão Permanente de Padronização Biologica da Liga das Nações (18) e do National Inst. of Health (19) expedidas sobre o doseamento das toxinas *oedematiens*. Usamos 4 lótes tão padronizados quanto possivel, em geral com a mesma idade e com peso variante de 17 a 20 gs.. A D.M.L., sendo aquela que mata alguns, mas não todos os camondongos injetados, exigiu que usassemos sempre lótes mais ou menos numerosos de camondongos. Com um lote de 60 animais determinamos a D.M.L.; com um de 68, a ação preventiva, com um de 73, a ação curativa e com um de 100, a ação neutralizante.

Não obstante as pesquizas de Grotova (20) sobre a via de inoculação venosa a que se deveria dar preferencia nos doseamentos da toxina do *Cl. oedematiens* preferimos seguir a tecnica indicada pela Liga das Nações (18), isto é, usamos a via muscular nas inoculações das toxinas de *Cl. oedematiens*. A vitamina C tambem foi aplicada por via muscular. A cada serie de pesquisas corresponderam testemunhos paralelos. Provas preliminares demonstraram: 1.°, que a toxina suportava bem a diluição em salina fisiologica com pH 6.6 (± 0.1); 2.°, que dóses de 25 mgs. eram bem suportadas pela via muscular; 3.°, que os nossos solutos de toxina *oedematiens* não continham cobre, conforme analises realizadas na secção de Quinica pelo nosso colega Carlos Slotta.

AÇÃO PREVENTIVA

Durante 3 dias seguidos, 46 animais receberam 10 mgs. de vitamina C por via muscular; destes, 22 receberam 1 D.M.L. e 24 receberam 2 D.M.L. de toxina; 22 animais serviram como testemunhos; 22, inoculados com 1 D.M.L. e 11 com 2 D.M.L. O periodo de observação foi prolongado por 72 horas, pois em alguns casos encontramos modificações após 48 horas de observação. Os resultados estão resumidos no quadro VII e grafico XV.

GRÁFICO XV
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24h.
48h.
72h.
1 DML. 10mgs. vit. C 3x24h.
2 DML. 10mgs. vit. C 3x24h.
1 DML. Test.
2 DML. Test.
GRÁFICO XVI
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24h
48h.
72h
1 DML. 25mgs. vit. C — 1h.
2 DML. 25mgs. vit. C — 1h.
1 DML. Test.
2 DML. Test.

QUADRO VII

AÇÃO PREVENTIVA DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DE CL. OEDEMATIENS

VITAMINA C						Toxina Doses	ANIMAIS						
Intervalos das inoculações			DOSES				Inoculados	Mortos em 24 hs.	Sobreviventes % em 24 hs.	Mortos em 48 hs.	Sobreviventes % em 48 hs.	Mortos em 72 hs.	Sobreviventes % em 72 hs.
24 hs.	24 hs.	34 hs.	10 mgs.	10 mgs.	10 mgs.	1 D.M.L.	22	2/22	90,9%	3/22	86,3%	3/22	86,3%
			10 mgs.	10 mgs.	10 mgs.	2 D.M.L.	24	9/24	62,5%	9/24	62,5%	9/24	62,5%
						1 D.M.L.	11	4/11	63,6%	5/11	54,6%	5/11	54,5%
						2 D.M.L.	11	6/11	45,4%	8/11	27,2%	8/11	27,2%

NOTA — Não houve alteração apos 72 horas de observação

AÇÃO CURATIVA

Procuramos verificar: 1.º, qual o periodo em que a vitamina C poderia exercer ação curativa; 2.º, si dóses repetidas de vitamina C teriam ação curativa maior do que as dóses unicas. 73 animais foram divididos em 5 lotes: o 1.º lote recebeu 25 mgs. de vitamina C, 1 hora depois de inoculado com 1 e 2 D.M.L. de toxina *oedematiens* (grafico XVI).

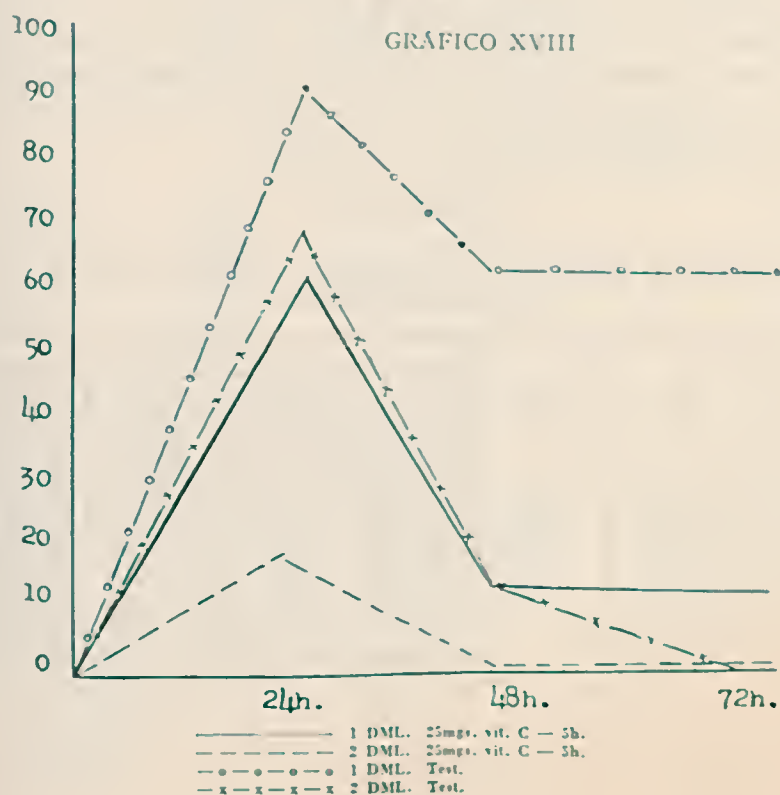
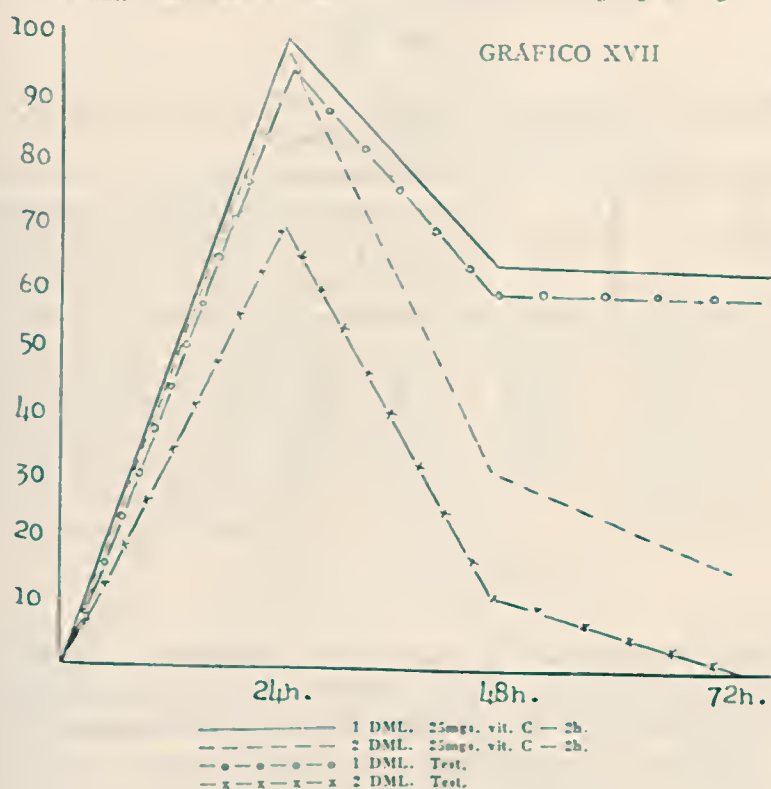
O 2.º lote recebeu 25 mgs. de vitamina C, 2 horas depois de inoculado com 1 e 2 D.M.L. de toxina *oedematiens* (grafico XVII).

O 3.º lote recebeu 25 mgs. de vitamina C, 5 horas depois de inoculado com 1 e 2 D.M.L. de toxina *oedematiens* (grafico XVIII).

O 4.º lote recebeu 2 dóses de 10 mgs. de vitamina C com intervalos de 1 e 3 horas após ter recebido a toxina *oedematiens*. (grafico XIX).

O ultimo lote serviu de testemunho.

Os resultados estão resumidos no quadro VIII.

GRAFICO XVII
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
24h.
48h.
72h.
1 DML. 25mgs. vit. C — 2h.
2 DML. 25mgs. vit. C — 2h.
1 DML. Test.
2 DML. Test.
GRAFICO XVIII
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24h.
48h.
72h.
1 DML. 25mgs. vit. C — 5h.
2 DML. 25mgs. vit. C — 5h.
1 DML. Test.
2 DML. Test.

QUADRO VIII

AÇÃO CURATIVA DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO CL. OEDEMATIENS

Intervalo Inoc. toxina: Inoc. Vit. C	Toxina Doses	Vitamina C Doses	ANIMAIS						
			Inoculados	Mortos em 24 hs.	Sobrevi-ventes % em 24 hs.	Mortos em 48 hs.	Sobrevi-ventes % em 48 hs.	Mortos em 72 hs.	Sobrevi-ventes % em 72 hs.
1 hora	1 D. M. L.	25 mgs.	8	0/8	100 %	3/8	63,3 %	3/8	63,3 %
1 hora	2 D. M. L.	25 mgs.	6	0/6	100 %	4/6	33,3 %	5/6	16,6 %
2 horas	1 D. M. L.	25 mgs.	8	0/8	100 %	3/8	63,3 %	3/8	63,3 %
2 horas	2 D. M. L.	25 mgs.	6	0/8	100 %	4/6	33,3 %	5/6	16,6 %
5 horas	1 D. M. L.	25 mgs.	8	3/8	63,3 %	7/8	12,5 %	7/8	12,5 %
5 horas	2 D. M. L.	25 mgs.	6	5/6	16,6 %	6/6	0 %	6/6	0 %
1 e 3 horas	1 D. M. L.	10-10 mgs.	8	0/8	100 %	0/8	100 %	1/8	87,5 %
1 e 3 horas	2 D. M. L.	10-10 mgs.	6	2/6	16,6 %	4/6	16,6 %	6/6	0 %
—	1 D. M. L.	—	10	1/10	90 %	4/10	60 %	4/10	60 %
—	2 D. M. L.	—	7	2/7	71,4 %	6/7	14,2 %	7/7	0 %

AÇÃO NEUTRALIZANTE

Procuramos verificar: 1.°, si a vitamina C neutralizava a toxina do *Cl. oedematiens*; 2.°, si esta neutralização obedecia á lei das proporções multiplas; 3.°, si o tempo de contacto exercia influencia sobre o poder neutralizante. A vitamina C em dóses de 10 a 25 mgs. foi deixada em contacto a 30° C por 30 minutos com 1 e 2 D.M.L. de toxina do *Cl. oedematiens* (grafico XX).

Em outra serie de ensaios, 10 a 25 mgs. de vitamina C permaneceram em contacto a 30° C., durante 60 minutos, com 1 e 2 D.M.L. de toxina (grafico XXI).

As misturas foram injetadas por via muscular. Os resultados estão resumidos no quadro IX.

QUADRO IX

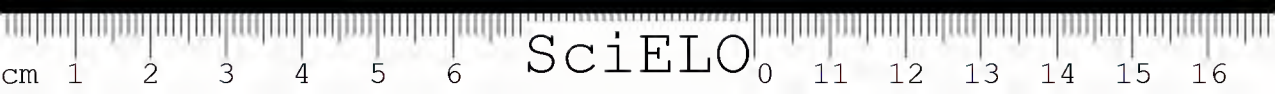
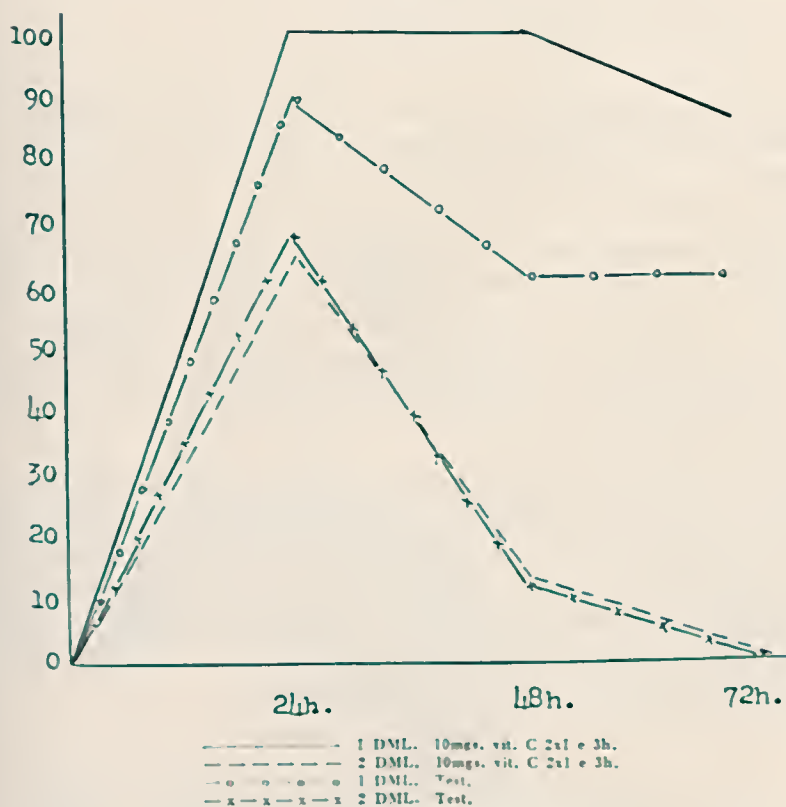
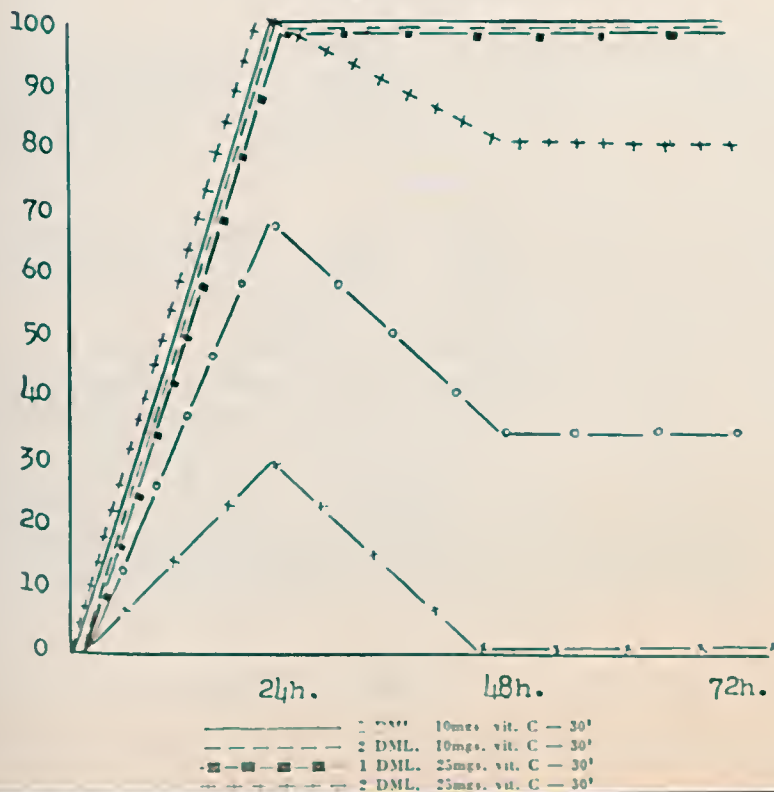
AÇÃO NEUTRALIZANTE DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO CL. OEDEMATIENS

Tempo de contacto	Toxina Doses	Vitamina C Doses	ANIMAIS						
			Inoculados	Mortos em 24 hs.	Sobrevi-ventes % em 24 hs.	Mortos em 48 hs.	Sobrevi-ventes % 48 hs.	Mortos em 72 hs.	Sobrevi-ventes % 72 hs.
30 minutos	1 D. M. L.	10 mgs.	10	0/10	100 %	0/10	100 %	0/10	100 %
30 minutos	1 D. M. L.	25 mgs.	10	0/10	100 %	0/10	100 %	0/10	100 %
30 minutos	2 D. M. L.	10 mgs.	10	0/10	100 %	0/10	100 %	0/10	100 %
30 minutos	2 D. M. L.	25 mgs.	10	0/10	100 %	2/10	80 %	2/10	[illegible]
60 minutos	1 D. M. L.	10 mgs.	10	0/10	100 %	0/10	100 %	1/10	100 %
70 minutos	2 D. M. L.	25 mgs.	10	0/10	100 %	0/10	100 %	0/10	100 %
—	1 D. M. L.	T	20	6/20	70 %	13/20	35 %	13/20	35 %
—	2 D. M. L.	T	20	14/20	30 %	20/20	0 %	20/20	[illegible]

NOTA — Não houve alteração após 72 horas de observação.

GRÁFICO XIX

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24h.
48h.
72h.
1 DML. 10mgs. vit. C 2x1 e 3h.
2 DML. 10mgs. vit. C 2x1 e 3h.
1 DML. Test.
2 DML. Test.

GRÁFICO XX
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24h.
48h.
72h.
10mgs. vit. C — 30'
2 DML. 10mgs. vit. C — 30'
1 DML. 25mgs. vit. C — 30'
2 DML. 25mgs. vit. C — 30'

CONCLUSÕES

1.ª — A vitamina C (acido l-ascorbico), aumentando a resistencia organica, torna os animais mais resistentes contra 1 D.M.L. de toxina de *Cl. oedematiens.*

2.ª — A vitamina C tem sobre a toxina do *Cl. oedematiens* fraca ação curativa, a qual se manifesta até 2 horas depois da inoculação de 1 e 2 D.M.L. de toxina; a vitamina C não exerce nenhuma ação curativa 5 horas depois de inoculadas 1 ou 2 D.M.L. de toxina; dóses de 10 mgs. de vitamina C, repetidas 1 e 3 horas depois, têm mais nitida ação curativa contra 1 D.M.L. de toxina do Cl. oedematiens do queumadóse unica de 25 mgs., sendo, porém, sem ação contra 2 D.M.L..

3.ª — A vitamina C tem nitida ação neutralizante sobre a toxina do *Cl. oedematiens;* não foi possivel observar si esta ação neutralizante segue a lei das proporções multiplas; o tempo de contacto reforça a ação neutralizante da vitamina C sobre a toxina do *Cl. oedematiens;* não foi verificada si as misturas neutralizantes eram antigenicas; dóses de 10 mgs. de vitamina C têm ação inativante mais intensa sobre 2 D.M.L. do que 25 mgs., parecendo haver uma relação ou fator ponderal para a neutralização ótima.

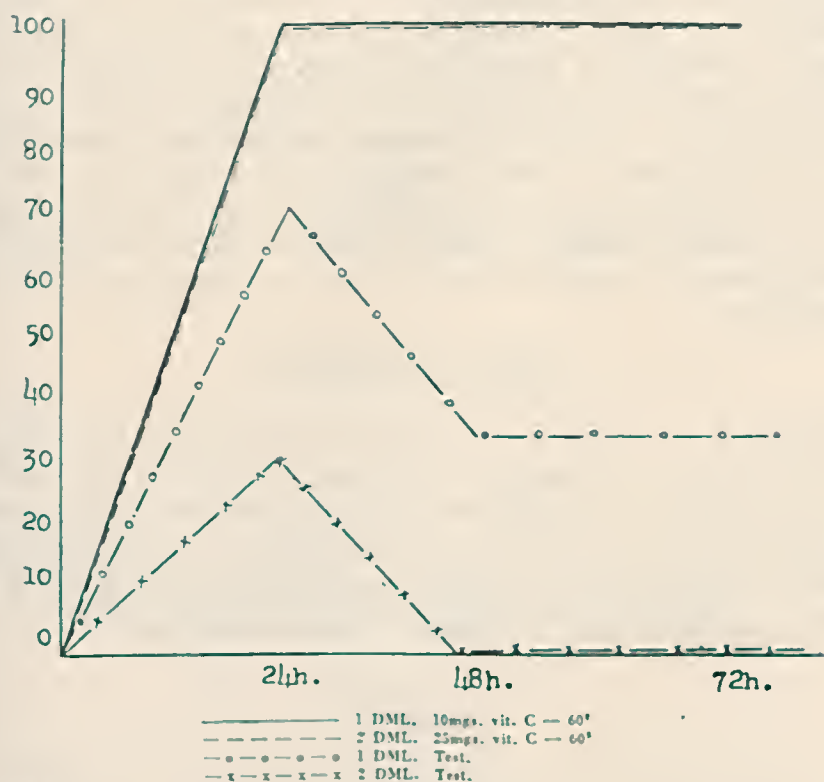
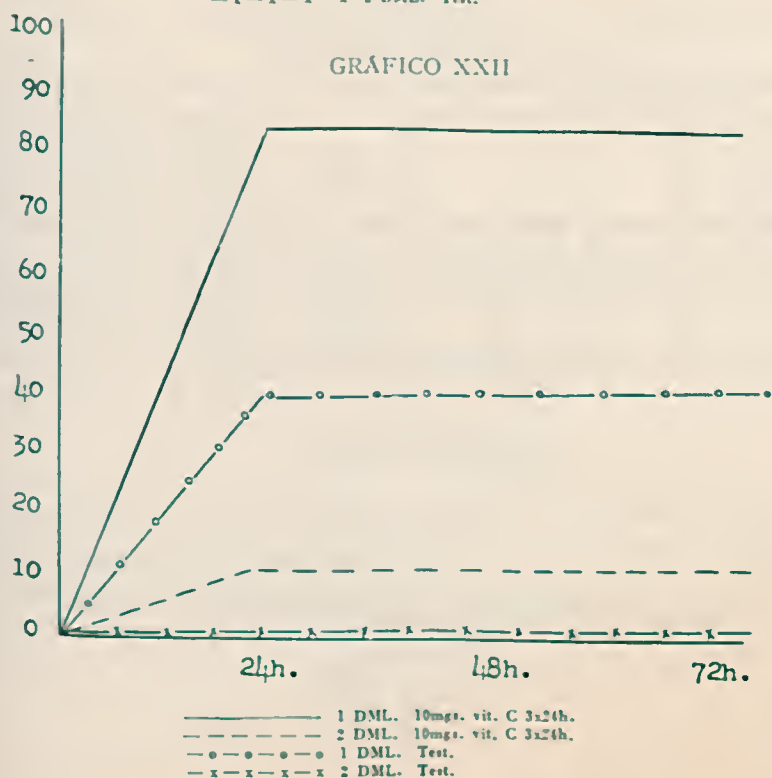
AÇÃO DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO **CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM**

Toxina utilizada — Toxina seca preparada pela precipitação, por meio de sulfato de amonio, do filtrado isento de germes e proveniente de cultura de 18 a 20 horas a 37° C. O precipitado foi recolhido e seco em baixa temperatura sobre cloreto de calcio e depois sobre anidrido fosforico até peso constante. A D.M.L. desta toxina era de 0,00003.

Vitamina C — Usamos vitamina C (acido l-ascorbico) quimicamente puro, na diluição de 50 mgs. por centimetro cubico, com pH 6,6 (± 0,1). Agradecemos á Casa Bayer a gentileza de no-la ter fornecido

Animais de próva — Adotamos o camondongo, de acôrdo com a recomendação da Comissão Permanente de Padronização Biologica da Liga das Nações (21) e (22), expedidas sobre doseamentos de toxinas de *Cl. histolyticum.*

Foram utilizados 4 lótes tão padronizados quanto possivel, em geral com a mesma idade e com o peso variavel de 17 a 20 gs.. A D.M.L., sendo definida como aquela que mata alguns, mas não todos os animais injetados, exigiu que usassemos sempre lótes mais ou menos numerosos de animais. Com

GRÁFICO XXI
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24h.
48h.
72h.
1 DML. 10mgs. vit. C — 60'
2 DML. 25mgs. vit. C — 60'
1 DML. Test.
2 DML. Test.
100
GRÁFICO XXII
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24h.
48h.
72h.
1 DML. 10mgs. vit. C 3x24h.
2 DML. 10mgs. vit. C 3x24h.
1 DML. Test.
2 DML. Test.

um lóte de 60 animais determinamos a D.M.L.; com um lóte de 56, a ação preventiva; com um de 60, a ação curativa e com um de 61, a ação neutralizante. As inoculações de toxina foram sempre pela via muscular, a não ser nas misturas neutralizantes, em que as injeções de vitamina C foram inoculadas pela via venosa. A cada serie de pesquisas corresponderam testemunhos paralelos. Foi verificado: 1.º, que a toxina suportava a diluição em salina fisiologica com pH 6,6 (± 0,1): 2.º, que dóses de 25 mgs. eram bem suportadas pela via muscular e venosa; 3.º, que os solutos de toxina não cotinham traços de cobre, conforme analises realizadas na secção de Quimica pelo nosso colega Carlos Slotta.

AÇÃO PREVENTIVA

Durante 3 dias seguidos, 36 animais receberam 10 mgs. de vitamina C pela via muscular. Em seguida, 18 receberam 1 D.M.L. e 18 receberam 2 D.M.L. de toxina do *Cl. histolyticum;* 30 animais serviram como testemunhos: 15 foram inoculados com 1 D.M.L. e 15 com D.M.L. As observações foram conduzidas durante 96 horas, só tendo mostrado variações dentro de 48 horas.

Os resultados acham-se resumidos no Quadro X e Grafico XXII.

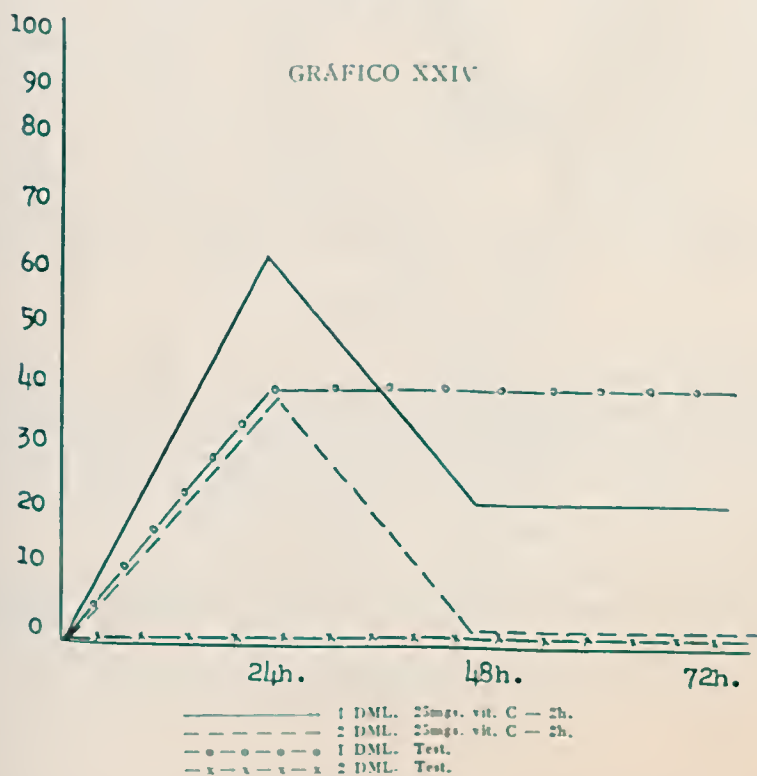
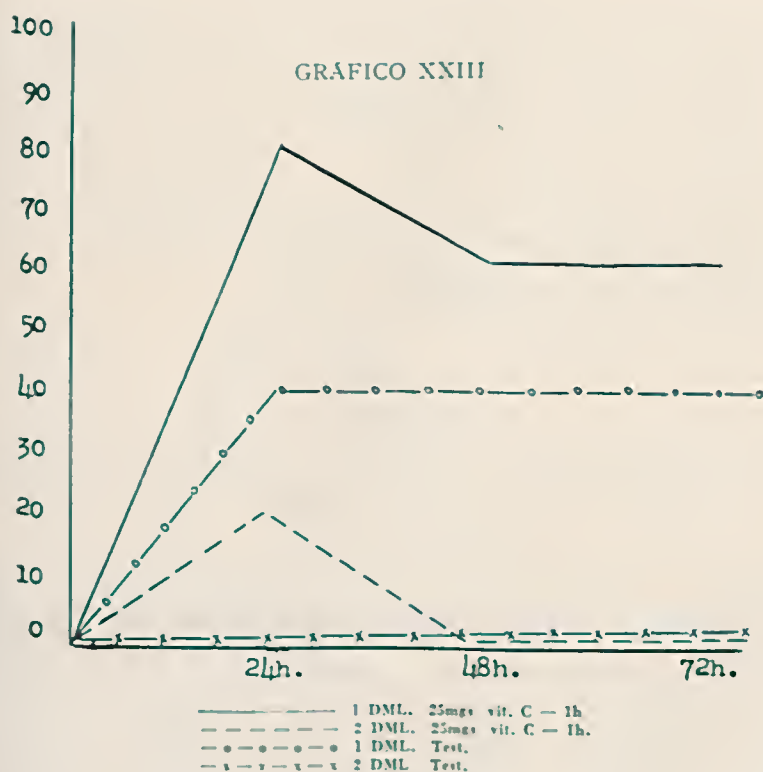
QUADRO X

ACÇÃO PREVENTIVA DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO **CL. HISTOLYTICUM**

VITAMINA C						Toxina Doses	ANIMAIS				
Intervalos das inoculações			Doses				Inoculados	Mortos em em 24 hs.	Sobrevi-ventes % em 24 hs.	Mortos em 48 hs.	Sobrevi-ventes % em 48 hs.
24 hs.	24 hs.	24 hs.	10 mgs. 10 mgs.	10 mgs. 10 mgs.	10 mgs. 10 gms.	1 D.M.L. 2 D.M.L. 1 D.M.L. 2 D.M.L.	18 18 15 15	2/18 16/18 6/15 15/15	84,3 % 11,1 % 40 % 0 %	3/18 16/18 6/15 15/15	83,3 % 11,1 % 40 % 0 %

AÇÃO CURATIVA

Procuramos verificar: 1.º, qual o periodo maximo em que a vitamina C poderia exercer sua ação curativa; 2.º, si dóses repetidas de vitamina C teriam ação curativa maior do que dóses unicas. 60 animais foram divididos em 5 lótes: o 1.º lóte recebeu 25 mgs. de vitamina C, 1 hora depois de ter sido inoculado com 1 e 2 D.M.L. (Grafico XXIII).

GRÁFICO XXIII
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24h.
48h.
72h.
1 DML. 25mgs vit. C — 1h
2 DML. 25mgs vit. C — 1h.
1 DML. Test.
2 DML Test.
GRÁFICO XXIV
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24h.
48h.
72h.
1 DML. 25mgs. vit. C — 2h.
2 DML. 25mgs. vit. C — 2h.
1 DML. Test.
2 DML. Test.

O 2.º lóte recebeu 25 mgs. de vitamina C, 2 horas depois de ter sido inoculado com 1 e 2 D.M.L. de toxina do *Cl. histolyticum* (grafico XXIV).

O 3.º lóte recebeu 25 mgs. de vitamina C, 5 horas depois de ter sido inoculado com I e 2 D.M.L. de toxina do *Cl. histolyticum* (grafico XXV).

O 4.º lóte recebeu 2 dóses de 10 mgs. de vitamina C, com intervalos de 1 e 3 horas após ter recebido a toxina histolitica (grafico XXVI).

O ultimo lóte serviu de testemunho.

Os resultados se acham resumidos no Quadro XI.

QUADRO XI

AÇÃO PREVENTIVA DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO **CL. HISTOLYTICUM**

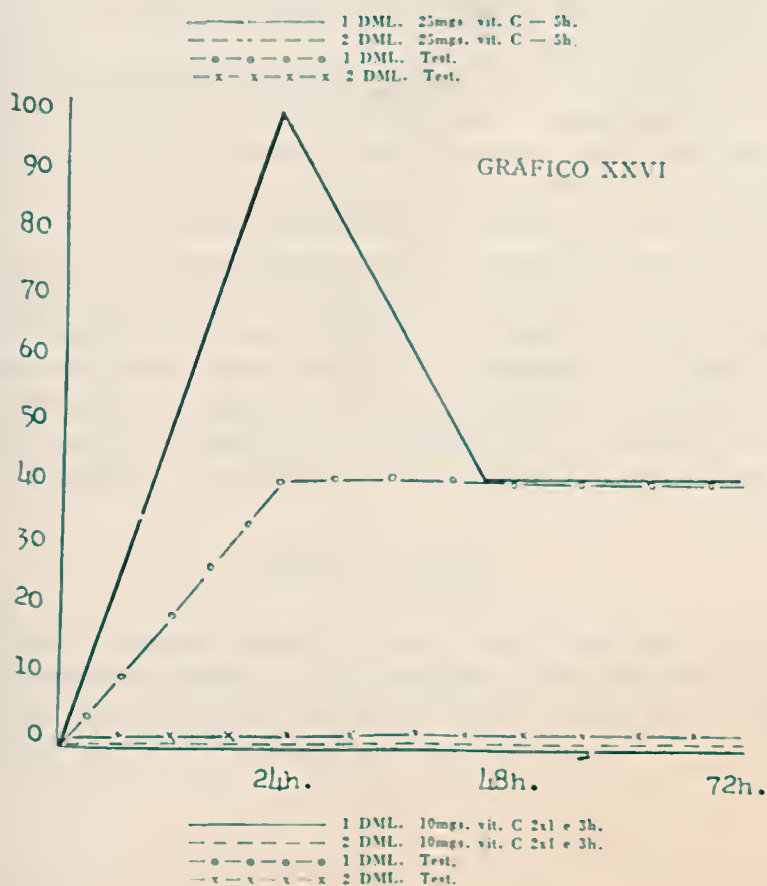
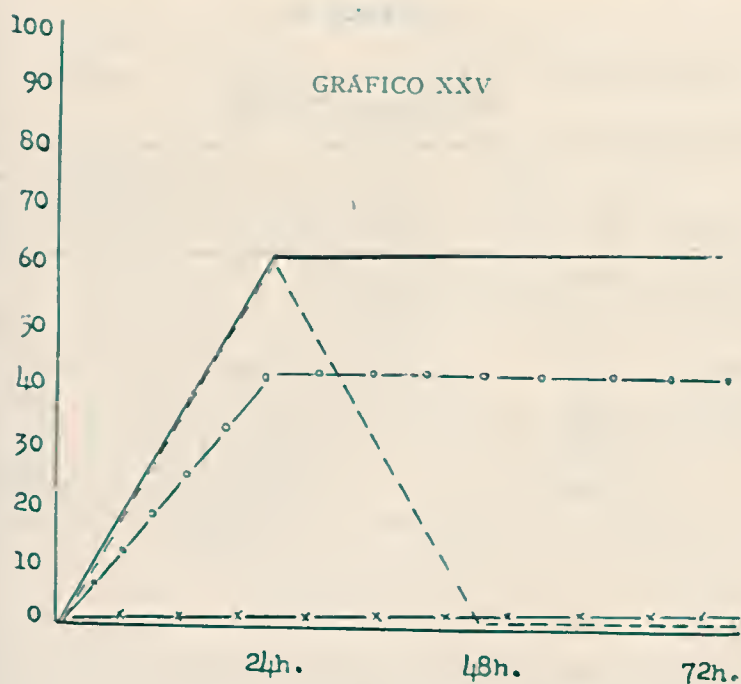
Intervalos Inoc. toxina: Inoc. vit. C	Toxina Doses	Vitamina C Doses	ANIMAIS				
			Inoculados	Mortos em 24 hs.	Sobreviventes % em 24 hs.	Mortos em 48 hs.	Sobreviventes % em 48 hs.
1 hora	1 D.M.L.	25 mgs.	5	1/5	80%	2/5	60%
1 hora	2 D.M.L.	25 mgs.	5	4/5	20%	2/5	20%
2 horas	1 D.M.L.	25 mgs.	5	2/5	60%	4/5	20%
2 horas	2 D.M.L.	25 mgs.	5	3/5	40%	5/5	0%
5 horas	1 D.M.L.	25 mgs.	5	2/5	60%	2/5	60%
5 horas	2 D.M.L.	25 mgs.	5	2/5	60%	5/5	0%
1 e 3 horas	1 D.M.L.	10-10 mgs.	5	0/5	100%	3/5	40%
1 e 3 horas	2 D.M.L.	10-10 mgs.	5	5/5	0%	5/5	0%
	1 D.M.L.	T	10	6/10	40%	6/10	40%
	2 D.M.L.	T	10	10/10	0%	10/10	0%

AÇÃO NEUTRALIZANTE

Procuramos verificar: 1.º, si a vitamina C neutralizava a toxina do *Cl histolyticum*; 2.º, si esta ação neutralizante obedecia á lei das proporções multiplas; 3.º, si o tempo de contacto exercia alguma influencia sobre o poder neutralizante. Foi posta em contacto a toxina do *Cl. distolyticum* com I D.M.L. de vitamina C por 30 minutos a 30º C. (grafico XXVII).

Em uma outra serie de ensaios I e 2 D.M.L. de toxina permaneceram por 60 minutos em contacto a 30º C. com 10 e 25 mgs. de toxina, respetivamente (grafico XXVIII).

Os resultados estão resumidos no Quadro XII.

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
GRÁFICO XXV
24h.
48h.
72h.
1 DML. 25mgs vit. C — 5h.
2 DML. 25mgs. vit. C — 5h.
1 DML. Test.
2 DML. Test.
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
GRÁFICO XXVI
24h.
48h.
72h.
1 DML. 10mgs. vit. C 2x1 e 3h.
2 DML. 10mgs. vit. C 2x1 e 3h.
1 DML. Test.
2 DML. Test.

QUADRO XII

AÇÃO CURATIVA DA VITAMINA C SOBRE A TOXINA DO CL. HISTOLYTICUM

Tempo de contacto	Toxinas Doses	Vitamina C Doses	ANIMAIS				
			Inoculados	Mortos em 24 hs.	Sobreviventes % em 24 hs.	Mortos em 48 hs.	Sobreviventes % em 48 hs.
30 minutos	1 D.M.L.	10 mgs.	5	1/5	80 %	1/5	80 %
30 minutos	1 D.M.L.	25 mgs.	5	1/5	80 %	1/5	80 %
30 minutos	2 D.M.L.	10 mgs.	5	1/5	80 %	3/5	40 %
30 minutos	2 D.M.L.	25 mgs.	5	3/5	40 %	4/5	20 %
60 minutos	1 D.M.L.	10 mgs.	10	0/10	100 %	1/10	90 %
60 minutos	2 D.M.L.	25 mgs.	10	7/10	30 %	9/10	10 %
	1 D.M.L.	T	11	4/11	63,6%	6/11	45,4%
	2 D.M.L.	T	12	10/12	16,6%	10/12	16,6%

CONCLUSÕES

1.ª — A vitamina C (acido 1-ascorbico) parece aumentar a resistencia organica do camondongo, tornando-o mais resistente contra 1 e 2 D.M.L. de toxina do *Cl. histolyticum*.

2.ª — A vitamina C tem ação curativa contra 1 D.M.L. de toxina; esta ação se manifesta sómente 1 hora depois da injeção da toxina; após 2 horas ha desigualdade na ação anti-toxica; dóses repetidas de 10 mgs. de vitamina C, com intervalo de 1 e 3 horas após a injeção de 1 e 2 D.M.L., não exercem ação curativa sobre a toxina de *Clostridium histolyticum*.

3.ª — A vitamina C parece ter ação neutralizante sobre a toxina do *Clostridium histolyticum;* esta ação neutralizante não segue a lei das proporções multiplas; o tempo de contacto não aumenta o poder neutralizante da vitamina sobre a toxina; não verificamos si as misturas neutralizantes eram antigenicas; dóses de 10 mgs. de vitamina C parecem ter maior ação inativante sobre 2 D.M.L. de toxina do *Cl. histolyticum* do que dóses de 25 mgs., mostrando, assim, que ha talvez uma relação ou fator ponderal de neutralização ótima.

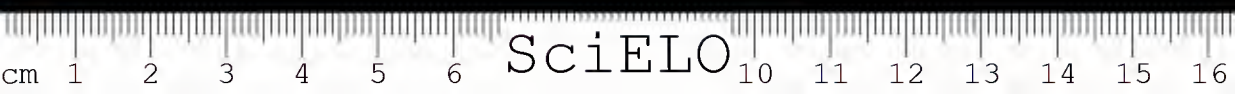
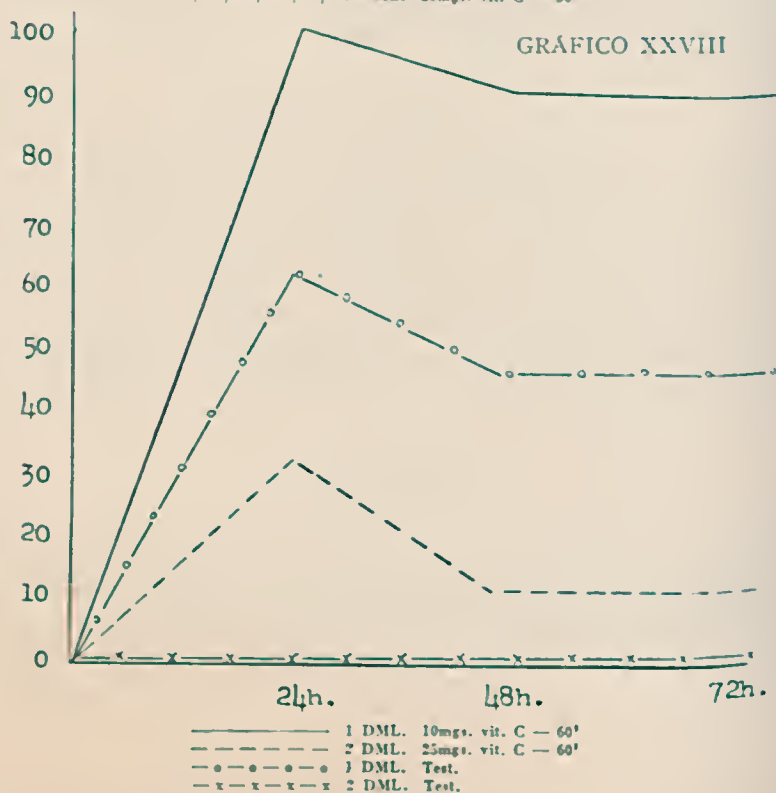
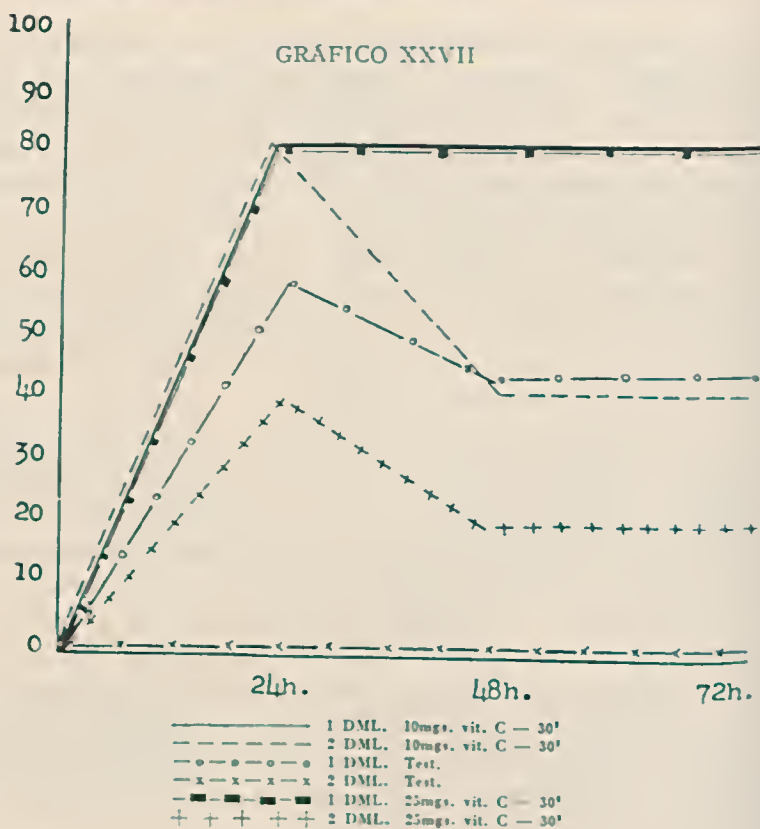
RESUMO GERAL

1.º — A vitamina C (acido 1-ascorbico) parece estimular certas reações do organismo, aumentando-lhe a resistencia contra as toxinemias gangrenosas.

2.º — A vitamina C (acido 1-ascorbico), injetada 1 hora depois da inoculação de 1 D.M.L. das toxinas gangrenosas, exerce nitida ação curativa;

injetadas 1 hora depois da inoculação de 2 D.M.L. das toxinas de *Clostridium welchii, oedematiens* e *oedematis maligni* (vibrião septico) tem fraca ação curativa, e nenhuma contra 2 D.M.L. da toxina do *Clostridium histolyticum*. Injetada 2 e 5 horas depois da inoculação de 1 e 2 D.M.L. das toxinas gangrenosas, tem ação curativa irregular ou nula. Injetoda em dóses repetidas, com intervalos de 1 e 3 horas, tem ação curativa contra 1 D.M.L. das toxinas *welchii, oedematiens* e *oedematis maligni;* contra 2 D.M.L. destas toxinas, as injeções repetidas de vitamina C não demonstraram ação curativa, nem sobre 1 ou 2 D.M.L. da toxina do *Clostridium histolyticum*. Em dóses repetidas, num total de 20 mgs. exerce ação curativa mais intensa do que dóses unicas de 25 mgs. em todos os casos em que atuou.

3.º — A vitamina C (acido l-ascorbico) parece exercer ação neutralizante *in vitro* sobre a stoxinas de *Clostridium oedematis maligni* (vibrião septico), *Cl. oedematiens* e *Cl. histolyticum*. A ação neutralizante sobre a toxina do *Cl. oedematiens* e *Cl. histolyticum* parece exercer dentro de uma zona limite. O tempo de contacto aumenta a ação neutralizante da vitamina C contra as toxinas que ela tem ação. A vitamina C (acido l-ascorbico) parece não exercer ação neutralizante *in vitro* sobre a toxina do *Clostridium welchii*, parecendo sensibilizar o organismo do animal ás misturas de toxina, vitamina ou dar em contato com a toxina do *Clostridium welchii*, produtos de degradação mais toxicos para o camondongo do que a toxina só. A intensidade da ação toxica destes produtos é diretamente proporcional: ao tempo das misturas toxina, vitamina e a quantidade de vitamina usada.

GRÁFICO XXVII
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24h.
48h.
72h.
1 DML. 10mgs. vit. C — 30'
2 DML. 10mgs. vit. C — 30'
1 DML. Test.
2 DML. Test.
1 DML. 25mgs. vit. C — 30'
2 DML. 25mgs. vit. C — 30'
GRÁFICO XXVIII
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
24h.
48h.
72h.
1 DML. 10mgs. vit. C — 60'
2 DML. 25mgs. vit. C — 60'
1 DML. Test.
2 DML. Test.

ACTION DE LA VITAMINE C (ACIDE L-ASCORBIQUE) SUR LA TOXINE DU BACILLUS PERFRINGENS

PAR

A. BÜLLER SOUTO et C. LIMA

La gangrène gazeuze est essentiellement une toxémie. La résistence organique joue un rôle capital dans se pathogenèse. La moindre résistance de l'organisme, conséquence des guerres prolongées, est une des causes de l'extraordinaire fréquence et de la gravité insolite de la gangrène gazeuze.

Au cours d'une série d'experiences portant sur plus de 2.000 souris, nous avons pu constater l'influence in vivo de la vitamine C sur la résistence organique aux toxémies gangréneuses, ainsi que son action neutralisante in vitro.

L'action de la vitamine C sur les toxines diphtérique et tétanique, parmi d'autres, a été déjà bien observée.

Toxine utilisée. — Toxine sèche préparée en précipitant par le sulfate d'ammonium le filtrat d'une culture de Bacillus perfringens, de 18 à 20 heures a 37º. Le liquide surnageant recueilli et séché à la température de 2-5º, dans un exciccateur à vide sur acide sulfurique, a été conservé sur l'anhydride phosphorique. La D.M.M. de la toxine était 0,0004.

Vitamine C. — Nous avons employé une solution de vitamine C à 50 mgr. par c.c. et dont le pH était 6,6 (± 0,1).

Animaux d'épreuve. — Nous avons choisi les souris, qui, parmi les animaux sensibles, donnent des résultats plus constants à cause de leur capacité uniforme de synthétiser la vitamine. Nous avons employé 4 lots étalonnés, de même âge et de poids compris entre 17 et 20 gr.. La D.M.M. a été fixée avec un lot de 70 animaux; avec un second lot de 168 animaux nous avons déterminé l'action préventive; avec un troisième de 152, l'action curative et, avec un dernier de 118, l'action neutralisante. Les inoculations de la toxine du Bacillus perfringens ont été faites par voie veineuse et les injections de vitamine C par voie musculaire, a

l'eception des épreuves sur l'action neutralisante. Chaque série de recherches comportait ses témoins correspondants.

Des essais préliminaires ont été effectués afin de vérifier: 1.°) si la toxine supporterait bien la diluition saline a pH 6,6 (± 0,1) ; 2.°) si des doses de 25 mg.r de vitamine C seraient bien tolerées para les souris et par voie veineuse; 3.°) si les solutions de toxine contenaient du cuivre. Des analyses rigoureuses des solutions des toxines, faites par notre collegue Slotta, ont révélé que ces solutions étaient prtiquement exemptes de cuivre.

Action préventive. — On a utilité un lot de 168 souris, 112 animaux recevant pendant 3 jours, 10 mgr. de vitamine C par voie musculaire. Ce lot a été subdivisé en 2 autres: un de 57 animaux qui ont reçu 1D.M.M. de toxine et l'autre de 57 animaux, auxquels on donna 2 D.M.M. Comme témoin on a pris un lot de 56 souris, parmi lesquelles 26 ont reçu 1 D.M.M. et 30, 2 D.M.M.. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau I.

TABLEAU I

ACTION PRÉVENTIVE DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE PERFRINGENS.

VITAMINE C						Doses de toxine en D.M.M.	ANIMAUX				
Intervalles entre les injections			DOSES				Nombre d'inoculés	Nombre de morts en 24 h.	% après 24 h.	Nombre de morts en 48 h.	% après 48 h.
24 h.	24 h.	24 h.	10 mgs.	10 mgs.	10 mgs.	1 D.M.M.	55	11/55	80 %	14/55	7[illegible] %
			10 mgs.	10 mgs.	10 mgs.	2 D.M.M.	57	35/57	38,5 %	35/57	38,5 %
				T		1 D.M.M.	26	11/26	57,6 %	13/26	5[illegible] %
				T		2 D.M.M.	30	30/30	0 %	30/30	[illegible] %

NOTE:—Il n'y apaseu aucune changement aprés 48 heures d'observation.

Action curative. — Nous avons tâche d'établir 1.°) quelle serait la plus longue durée de lactivité curative de la vitamine C contre 1 et 2 D.M.M. de toxine du Bacillus perfringens et 2.°) si des doses de 10 mgr., répétées à intervalles de une et 3 heures, auraient une action curative plus forte que des doses uniques. A cette fin, 152 animaux ont été divisés en 5 lots: le premier, de 30 animaux, a été subdivisé en 2 autres de 15 animaux, auxquels on donna, respectivement, 1 D.M.M. et 2 D.M.M., chaque animal recevant, une heure après, 25 mgr. de vitamine C.

Le deuxieme lot, de 29 animaux a aussi été divisé en 2 autres de 15 et 14 animaux, qui ont reçu, respectivement, 1 et 2 D.M.M. de la toxine et, après 2 h., 25 mgr., de vitamine C. Le troisieme lot de 37 animaux, a reçu exactement comme les premiers 1 et 2 D.M.M. — de toxine et 3 h. plus tard, 25 mgr. de vitamine C. Au 4.º lot nous avons injecté, une et 3 h. après l'inoculation de une et 2 D.M.M. de toxine, 10 mgr. de vitamine C. Le 5.º lot, témoin, a reçu seulement une et 2 D.M.M. de toxine. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau II.

TABLEAU II

ACTION CURATIVE DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU BACILLUS PERFRINGENS.

Intervalle entre l'inoculation de la toxine et l'injection de vit. C	Doses de toxine en D.M.M	Doses de vit. C. en mgs.	Nombre d'animaux inoculés	Nombre de morts en 24 h.	% sur 24 h.	Nombre de morts en 48 h.	% sur 48 h.
1 heure	1 D.M.M.	25	15	3/15	80%	5/15	66,6%
	2 D.M.M.	25	15	14/15	6,6%	14/15	6,6%
2 heures	1 D.M.M.	25	15	4/15	73,3%	7/15	53,3%
	2 D.M.M.	25	14	12/14	14,2%	12/14	14,2%
3 »	1 D.M.M.	25	15	8/15	46,6%	9/15	40,0%
	2 D.M.M.	25	15	15/15	0,0%	15/15	0,0%
1 et 3 heures	1 D.M.M.	10-10	16	4/16	75%	4/16	75%
	2 D.M.M.	10-10	16	16/16	0%	16/16	0%
—	1 D.M.M.	T	15	7/15	53,3%	7/15	53,3%
	2 D.M.M.	T	15	15/15	0,0%	15/15	0,0%

NOTE:—Nulle alteration après 48 heures.

Action neutralisante in vitro. — Nous avons tâche de vérifier in vitro 1.º) si la vitamine C neutraliserait la toxine du Bacillus perfringens; 2.º) si cette neutralisation obérait à la loi des proportions multiples; 3.º) si le tempes de contact aurait quelque influence sur la neutralisation.

Une D.M.M. a été laissée en contact, pendant 30 min., avec 10 et 25 mgr. de vitamine C et ensuite inoculée respectivement à 15 et 13 souris; de même, 2 D.M.M. en contact pendant 30 min. avec les mêmes quantités de vitamine C, ont été inoculées à 2 lots de 15 souris. Une autre série d'experiences a été réalisée en laissant en contact, pendant 60 min., une D.M.M. avec 10 mgr. et 2 D.M.M. avec 25 mgr. de vitamine C. 2 lots de 15 souris étant inoculés avec chaque dose; à 30 souris témoins, en 2 lots de 15 on a inoculé, respectivement, une et 2 D.M.M..

Les résultats sont résumés dans le tableau III.

TABLEAU III

ACTION NEUTRALISANTE DE VITAMINE C SUR LA TOXINE PERFRINGENS

Temps de contact	Doses de toxine en mgrs.	Doses de vit. C	Nombre d'animaux inoculés	Nombre de morts en 24 hs.	% sur 24 h.	Nombre de morts en 48 h.	% sur 48 h.
30 minutes	1 D.M.M.	10	15	7/15	53,3%	9/15	40%
	1 D.M.M.	25	13	7/15	46,1%	9/15	30,7%
	2 D.M.M.	10	15	13/15	13,3%	14/15	6,6%
	2 D.M.M.	25	15	15/15	0%	15/15	0%
	1 D.M.M.	10	15	9/15	40%	10/15	33,3%
	2 D.M.M.	25	15	15/15	0%	15/15	0%
	1 D.M.M.	T	15	7/15	53,3%	7/15	53,3%
	2 D.M.M.	T	15	15/15	0%	15/15	0%

NOTE: Il n'y a pas eu de changement après 48 heures d'observation.

Conclusions. — 1) La vitamine C semble augmenter la résistance organique de la souris, qui devient moins sensible à l'action de la toxine du Bacillus perfringens.

2) La vitamine C exerce une action curative durant 1 heure après l'inoculation de la toxine du Bacillus perfringens, elle est inactive quand la toxine a été inoculée 2 et 3 heures auparavant. Des doses répétées de 10 mgr. données 1 et 3 heures à la suite de l'inoculation de une D.M.M., ont une action curative nette, mais sont inactives contre 2 D.M.M..

3) La vitamine C ne montre aucune action neutralisante in vitro, même après 60 minutes de contatc avec la toxine, et ne suit pas la loi des proportions multiples.

ACTION DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU VIBRION-SEPTIQUE

Toxine utilisée. — Toxine sèche préparée en précipitant par le sulfate d'ammonium le filtrat exempt de germes d'une culture de 48 heures a 37°. Le précipité a été recueilli et séché à la température de 7-5°, dans un exsiccateur a vide sur acide sulfurique, et ensuite sur l'anhydride phosphorique jusqu'à poids constant.

La D.M.M. de cette toxine était 0,00005.

Vitamine C. — Nous avons employé la vitamine C (acide 1-ascorbique) chimiquement pure, à la dilution de 50 mgr. par c.c. à pH 6,6 (± 0,1).

Animaux d'epreuve. — Nous avons utilisé la souris: 4 lots étalonnés, de même âge et de poids compris entre 17 et 20 gr.. Sur un lot de 50 animaux, nous avons fixé la D.M.M.; sur un autre, de 83, l'action préventive a été déterminée et, avec un troisième lot de 62 animaux, nous avons établi respectivement l'action curative et laction préventive.

Les inoculations de latoxine du vibrion septique ont été faites par voie musculaire veineuse et celles de la vitamine C par voie musculaire, à l'exception des experiences sur l'action neutralisante.

Chaque série de recherches avait ses témoins correspondants. Les expériences parallèles ont montré 1.°) que la toxine n'est pas modifiée quand on la dilue dans un liquide à pH 6,6 (± 0,1); 2.°) que des doses de 25 mgr. par voie veineuse et musculaire n'ont pas d'effect sur la vie des souris; 3.°) que, dans nos dilutions de la toxine du vibrion septique, le cuivre ne dépassait pas la dose de 0,2 gr., selon les analyses effectuées par Slotta.

Action préventive. — Nous avons utilisé un lot de 83 souris, dont 61 ont été injectées pendant 3 jours de suite avec 10 mgr. de vitamine C par voie musculaire. Ce lot a été divisé en2parties;30 ont reçu 1 D.M.M. et a 31 on a injecté 2 D.M.M. de la toxine du vibrion septique. 10 animaux témoins ont reçu 1 D.M.M. et à 12 on a injecté 2 D.M.M. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau IV.

TABLEAU IV

ACTION PRÉVENTIVE DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU VIBRION-SÉPTIQUE

VITAMINE C						Doses de toxine en D. M. L.	ANIMAUX				
Intervalles entre les injections			Doses				Nombre d'inoculés	Nombre de morts en 24 h.	% sur 24 h.	Nombre de morts en 48 h.	% sur 48 h.
24 h.	21 h	21 h.	10 mgs.	10 mgs.	10 mgs	1 D. M. L.	30	7|30	76,6%	7|30	76,6%
			10 mgs.	10 mgs.	10 mgs.	2 D. M. L.	31	15|31	51,7%	15|31	51,7%
						1 D. M. L.	10	5|10	50 %	5|10	50 %
						2 D. M. L.	12	10|12	16,6%	10|11	16,6%

NOTE: Il n'y a pas eu aucune changement après 48 heures d'observation.

Action curative. — Notre but était de vérifier 1.º) si la vitamine C aurait une action curative sur la toxine du vibrion septique; 2.º) quel serait le plus long intervalle pour qu'une telle action puisse s'exercer; 3.º) si des doses répétées de 10 mgr. de vitamine C auraient une action curative plus grande que des doses uniques.

Un lot de 62 souris a été divisé en 5. Les animaux du premier lot ont été inoculés avec 1 D.M.M. et 2 D.M.M. de toxine, et ont reçu, une heure après, 25 mgr. de vitamine C. Dans le deuxieme lot, les animaux ont été injectés avec 1 et 2 D.M.M. et 2 heures après, avec 25 mgr. de vitamine C. Au 3.º lot, 1 et 2 D.M.M. ont été données et, au bout de 2 h., 25 mgr. de vitamine C. Le 4.º a été inoculé avec 1 et 2 D.M.M. et reçu, aux intervalles d'une et de 5 h., 10 mgr. de vitamine C. Le 5.º lot, qui a reçu 1 et 2 D.M.M., a servi de témoin. Les résultats de cette expérience sont résumés dans le tableau V.

TABLEAU V

ACTION NEUTRALISANTE DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU VIBRION-SEPTIQUE

Intervalles entre inoc. de toxine et les inj. de vit. C	Doses de toxine en D. M. L.	Doses de vit. C en D. M. L.	Nombre d'inoculés	Nombre de morts en 24 h.	% sur 24 h.	Nombre de morts en 48 h.	% sur 48 h.
1 heure	1 D.M.M.	25	5	2/5	60%	2/5	60%
1 heure	2 D.M.M.	25	5	2/5	60%	3/5	40%
2 heures	1 D.M.M.	25	5	2/5	60%	3/5	40%
2 heures	2 D.M.M.	25	5	3/5	40%	3/5	40%
5 heures	1 D.M.M.	25	5	1/5	80%	2/5	60%
5 heures	2 D.M.M.	25	5	3/5	40%	4/5	20%
1 et 3 heures	1 D.M.M.	10-10	5	0/5	100%	0/5	100%
1 et 3 heures	2 D.M.M.	10-10	5	4/5	20%	5/5	0%
—	1 D.M.M.	—	10	5/10	50%	5/10	50%
—	2 D.M.M.	—	12	10/12	16,6%	10/12	16,6%

NOTA: Nulle altération après 48 heures d'observation.

Les irregularités dans l'action antitoxique de la vitamine C qu'on peut nettement constater dans le tableau V, ont été observées par Harde et Greenwald, Grooten et Bezssonoff.

Action neutralisante. — Nous avons tâché encore ici d'établir; 1.º) si la vitamine C neutraliserait la toxine du vibrion septique; 2.º) si cette neutralisation

obéirait à la loi des proportions multiples; 3.°) si le temps de contact aurait de l'influence sur le pouvoir neutralisant de la vitamine C.

Des doses de 10 et 25 mgr. de vitamine C ont été mises en contact, durant 30 min. à 30°, avec 1 et 2 D.M.M. de toxine du vibrion septique. Dans une autre série d'essais nous avons laissé des doses égales de vitamine C en contact, pendant 60 min. a 30°, respectivement avec 1 et 2 D.M.M. de toxine du vibrion septique; tous les mélanges ont été injectés par voie veineuse. Les résultats sont résumés dans le tableau VI.

TABLEAU VI

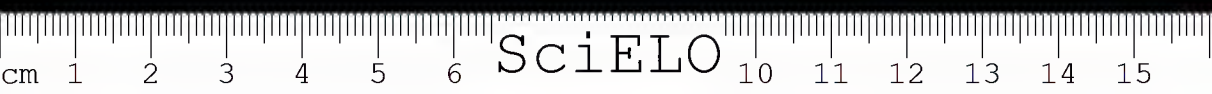
ACTION NEUTRALISANTE DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU VIBRION-SEPTIQUE

Temps de contact	Doses de toxine en D. M. M.	Doses de vit. C. en mgrs.	Nombre d'inoculés	Nombre de morts en 24 h.	% sur 24 h.	Nombre de morts en 48 h.	% sur 48 h.
30 minutes	1 D.M.M.	10	5	0/5	100%	0/5	100%
30 minutes	1 D.M.M.	25	5	0/5	100%	0/5	100%
30 minutes	2 D.M.M.	10	5	3/5	40%	3/5	40%
30 minutes	2 D.M.M.	25	5	2/5	60%	2/5	60%
60 minutes	1 D.M.M.	10	10	0/10	100%	0/10	100%
60 minutes	2 D.M.M.	25	10	0/10	100%	1/9	90%
—	1 D.M.M.	—	10	4/10	60%	4/10	60%
—	2 D.M.M.	—	12	10/10	16,6%	10/12	16,6%

NOTE: Il n'y a pas eu d'alteration au bout de 24 heures d'observation.

Conclusions. — 1) La vitamine C (acide l-ascorbique) semble conférer à la souris une plus grande résistance à l'action de la toxine du vibrion septique.

2) La vitamine C (acide l-ascorbique) possède une action curative contre 1 et 2 D.M.M., jusqu'à 1 heure après son inoculation; inoculé au bout de 2 heures, l'action antitoxique est inégale. L'action curative se manifeste jusqu'à après, ce qui est la limite actuelle de nos recherches. Des doses répétées de 10 mgr. 1 et 3 heures après l'injection de 1 D.M.M. de toxine du vibrion septique, confèrent la protection à 100p. 100 des animaux inoculés.

3) La vitamine C exerce sur la toxine du vibrion septique une action neutralisante qui semble obéir à la loi des proportions multiples. Le pouvoir neutralisante de la vitamine C sur la toxine du Cl. oedematis-maligni (vibrion septique) augmente avec le temps de contact.

ACTION DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU BACILLUS OEDEMATIENS

Nous avons recherchés l'action de la vitamine C sur la toxine du B. oedematiens.

Toxine utilisée. — Toxine sèche préparée par précipitation du filtrat exempt de germes, d'une culture de 6 jours à 37°, par le sulfate d'ammonium en atmosphere inerte. Le précipité a été recueilli et séché à la température de 2 à 5°. sur du chlorure de calcium te ensuite sur de l'anhydride phosphorique jusqu'à poids constant. Trituré et tamisé, il a été conservé dans des ampoules fermées dans le vide. La D.M.M. de cette toxine était 0,000242.

Vitamine C. — Nous avons employé la vitamine C (acide 1-ascorbique) chimiquement pure à la dilution de 50 mgr. par c.c., le pH 6,6 (± 0,1).

Animaux d'épreuve. — Nous avons utilisé des souris réparties en 4 lots étalonnés, du même âe et de poids oscillant entre 15 et 20 gr. Avec un lot de 60 animaux nous avons déterminé la D.M.M.; avec un autre, de 68 animaux. l'action curative; avec un troisième, de 73, l'action préventive et avec un dernier de 100, l'action neutralisante.

Malgré les recherches de Grotova sur la voie d'inculation qui doit être choisie pour les dosages de la toxine du B. oedematiens, nous avons donné la préférence à la technique indiquée par la Societé des Nations, c'est-à-dire que nous avons fait les inoculations de la toxine du Bacillus oedematiens par la voie musculaire; la vitamine C a été introduit par la même voie.

Des témoins correspondaient à chaque série de recherches. Des tests preliminaires ont révélé 1.°) que la toxine supporte bien la dilution en solution physiologique a pH 6,6 (— 0,1); 2.°) que des doses de 25 mgr. sont bien tolérées par voie musculaire; 3.°) que nos solutions de toxine oedematiens ne contiennent pas de cuivre, selon les analyses faites par Slotta.

Action préventive. — Pendant 3 jours consécutifs 46 animaux ont reçu 10 mgr. de vitamine C par voie musculaire. Parmi eux, 22 ont reçu une D.M.M., et 24 deux D.M.M.; 22 animaux ont servi de témoins; 11 ont été inoculés avec une D.M.M. et 11 avec deux D.M.M..

Le temps d'observation a été prolongé a 72 heures, car certains cas ont présenté des modifications apres 48 heures d'observation. Les résultats sont réunis dans le tableau VII.

TABLEAU VII

ACTION PRÉVENTIVE DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU CL. OEDEMATIENS

Intervalles entre les injections			Doses			Doses de toxine en D. M. M.	Nombre d'inoculés	Nombre de morts en 24 h.	% sur 24 h.	Nombre de morts en 48 h.	% sur 48 h.	Nombre de morts en 72 h.	% sur 72 h.
24 h.	21 h.	24 h.	10 mgs.	10 mgs.	10 mgs.	1 D. M. M.	22	2/22	90,8%	3/22	86,2%	3/22	86,3%
			10 mgs.	10 mgs.	10 mgs.	2 D. M. M.	21	9/24	62,5%	9/24	62,5%	9/21	62,5%
						1 D. M. M.	11	4/11	63,6%	5/11	54,5%	5/11	54,5%
						2 D. M. M.	11	6/11	45,4%	8/11	27,2%	8/11	72,2%

NOTE : Il n'y a pas eu d'alteration aprés 72 heures.

Actions curative. — Nous avons tâché d'établir 1.°) quelle est la période maxima pendant laquelle la vitamine C pourrait exercer une action curative ; 2.°) si des doses répétées de vitamine C aurraient une action curative plus grande que des doses uniques.

Soixante-treize animaux ont été distribués en 5 lots ; à 3 lots, 25 mgrs. de vitamine C ont donnés, respectivement une, deux et cinq heures après l'inoculation d'une et deux D.M.M. de toxine de B. oedematiens ; le quatrième lot a reçu 2 doses de 10 mgr. de vitamine C à des intervalles de une et trois heures après avoir reçu la toxine de B. oedematiens, et le cinquieme lot a servi de témoin. Les résultats sont résumés dans le tableau VIII.

TABLEAU VIII

ACTION CURATIVE DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU CL. OEDEMATIENS

Intervalles entre inoc. de toxine et les inj. de vit. C	Doses de toxine en D. M. M.	Doses de vit. C em mgs.	Nombre d'inoculés	Nombre de morts en 24 h.	% sur 24 h.	Nombre de morts en 48 h.	% sur 48 h.	Nombre de morts en 72 h.	% sur 72 h.
1 heure	1 D. M. M.	25	8	0/8	100 %	3/8	63,3%	3/8	63,3%
1 heure	2 D. M. M.	25	6	0/6	100 %	4/6	33,3%	5/6	16,6%
2 heures	1 D. M. M.	25	8	0/8	100 %	3/8	62,3%	3/8	63,3%
2 heures	2 D. M. M.	25	6	0/6	100 %	4/6	33,3%	5/6	16,6%
3 heures	1 D. M. M.	25	8	3/8	63,3%	7/8	12,5%	7/8	12,5%
3 heures	2 D. M. M.	25	6	5/6	16,6%	6/6	0 %	6/6	0%
1 et 3 heures	1 D. M. M.	10—10	8	0/8	100 %	0/8	100 %	1/8	87,5%
1 et 3 heures	2 D. M. M.	10—10	6	2/6	66,6%	5/6	16,6%	6/6	0%
—	1 D. M. M.	—	10	1/10	90 %	4/10	60 %	4/10	60%
—	2 D. M. M.	—	7	2/7	71,40	6/7	14,2%	6/7	0%

NOTE : Il n'y a pas eu d'alteration aprés 72 heures d'observation.

Action neutralisante. — Nous nous proposions de chercher 1.º) si la vitamine C neutraliserait la toxine du Bacillus oedematiens; 2.º) si cette neutralisation obéirait à la loi des proportions multiples; 3.º) si le temps de contact avait une influence sur le pouvoir neutralisant.

TABLEAU IX

ACTION NEUTRALISANTE DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU **CL. OEDEMATIENS**

Temps de contact	Doses de toxine	Doses de vit. en mgs.	Nombre d'inoculés	Nombre de morts en 24 h.	% sur 24 h.	Nombre de morts en 48 h.	% sur 48 h.	Nombre de morts en 72 h.	% sur 72 h.
30 minut.	1 D. M. M.	10	10	0/10	100 %	0/10	100 %	0/10	100 %
30 minut.	1 D. M. M.	25	10	0/10	100 %	0/10	100 %	0/10	100 %
30 minut.	2 D. M. M.	10	10	0/10	100 %	0/10	100 %	0/10	100 %
30 minut.	2 D. M. M.	25	10	0/10	80 %	0/10	80 %	2/10	80 %
60 minut.	1 D. M. M.	10	10	0/10	100 %	0/10	100 %	0/10	100 %
60 minut.	2 D. M. M.	25	10	0/10	100 %	0/10	100 %	0/10	100 %
—	1 D. M. M.	T	20	6/20	70 %	13/20	35 %	13/20	35 %
—	2 D. M. M.	T	20	14/20	30 %	20/20	0 %	20/20	0 %

NOTE: Nulle alteration au bout de 72 heures d'observation.

La vitamine C aux doses de 10 et 25 mgr., a été laissée en contact, à 30º et pendant 30 min., avec une et deux D.M.M. de toxine du Bacillus oedematiens. Dans une autre série d'essais, 10 et 25 mgr. de vitamine C sont restés en contact à 30º pendant 60 min. avec une et deux D.M.M. de toxine. Les mélanges ont été injectés par voie musculaire. Les résultats sont résumés dans le tableau IX.

..*Conclusions.* — 1) La vitamine C (acide 1-ascorbique), en augmentant la résistance organique, produit chez les animaux une plus grande résistance contre une D.M.M. de toxine du Bacillus oedematiens.

2) La vitamine C a sur la toxine du B. oedematiens une faible action curative, qui se manifeste jusqu'à deux heures apres l'inoculation d'une et deux D.M.M. de la toxine. La vitamine C n'exerce nulle action curative 5 heures après l'inoculation d'une et deux D.M.M. de toxine. Des doses de 10 mgr de vitamine C répétées à intervalles d'une et trois heures, ont une action curative nette contre une et deux D.M.M. de la toxine du Bacillus oedematiens: elles sont cepedant inactives contre deux D.M.M..

3) La vitamine C a une action neutralisante nette sur la toxine du B. oedematiens. Il n'a pas été possible d'observer si cette action, neutralisante suit la loi des proportions multiples. Un contact prolongé augmente l'action neutralisante de la vitamine C sur la toxine du Bacillus oedematiens.

Nous n'avons pas recherché le pouvoir antigénique des mélanges neutralisés. Des doses de 10 mgr. de vitamine C, ont pouvoir inactivant plus grand sur deux D.M.M. qu'une dose de 25 mgr.. Il semble exister une relation ou un facteur pondéral pour la meilleure neutralisation.

ACTION DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU BACILLUS HISTOLYTICUS

Toxine utilisée. — Toxine seche préparée en précipitant par le sulfate d'ammonium le filtrat, exempt de germes, d'une culture de 18 à 20 heures à 37°. Le précipité a été recueilli et séché à basse température sur du chlorure de calcium et ensuite sur de l'anhydride phosphorique jusqu'à poids constant. La D.M.M. de cette toxine était 0,00003.

Vitamine C. — Nous avons employé de la vitamine C (acide l-ascorbique) chimiquement pure à la dilution de 50 mgr. par c.c. a pH 6,6 (± 0,1).

Animaux d'épreuve. — Nous avons choisi la souris. Nous en avons utilisé 4 lots étalonnés, de même âge et pesant de 17 a 20 gr. Avec un lot de 60 animaux, nous avons déterminé la D.M.M.; avec un autre de 50, l'action préventive; avec un troisième de 60, l'action curative et, avec un dernier de 61, l'action neutralisante. Les inoculations de toxine ont toujours été faites par voie veineuse et les injections de vitamine C par voie musculaire, à exception des mélanges neutralisants.

Chaque série de recherches avait ses témoins correspondants. Il a été vérifié 1.°) que la toxine supporte la dilution en solution physiologique à pH 6,6 (± 0,1); 2.°) que des doses de 25 mgr. sont bien tolérées par les voies musculaire et veineuse; 3.°) que les solutions de toxine ne contenaient pas de traces de cuivre, suivant les analyses par Slotta.

TABLEAU X

ACTION PRÉVENTIVE DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU **CL. HISTOLYTICUM**

VITAMINE C							ANIMAUX				
Intervalles entre les injections			DOSES			Doses de toxine en D.M.M.	Nombre d'inoculés	Nombre de morts en 24 h.	% sur 24 h.	Nombre de morts en 48 h.	% sur 48 h.
24 h.	24 h.	24 h.	10 mgs.	10 mgs.	10 mgs.	1 D.M.M.	18	3|18	83,3%	3|18	83,3%
			10 mgs.	10 mgs.	10 mgs.	2 D.M.M.	18	16|18	11,1%	16|18	11,1%
						1 D.M.M.	15	6|15	40 %	6|15	40 %
						2 D.M.M.	15	15|15	0 %	15|15	0 %

NOTA: Il n'y a pas eu nulle alteration après 48 heures d'observation.

Les résultats sont restés les mêmes après 48 heures d'observation.

Action préventive. — Trente-six animaux ont reçu, pendant 3 jours consécutifs, 10 mgr. de vitamine C par voie musculaire. Ensuite 18 ont reçu une D.M.M. et 18, deux D.M.M. de toxine du B. histolyticus; 30 animaux ont servi de témoins; 15 ont été inoculés avec une D.M.M. et 15 avec deux D.M.M.

Des observations ont été poursuivies pendant 92 heures, des variations n'apparaissant que dans les 48 heures.

Action curative. —Nous nous proposions d'établir; 1.°) la période maxima pendant laquelle la vitamine C exercerait son action curative; 2.°) si des doses répétées de vitamine C auraient une action curative plus grande que des doses uniques.

Soixante animaux ont été divisés en 5 lots ont reçu 25 mgr. de vitamine C, une, deux et cinq heures après avoir été inoculés avec une et deux D.M.M de la toxine du B. histolyticus; le 4.° lot a reçu 2 doses de 10 mgr. de vitamine C a intervalle d'une et trois heures apres l'inoculation de la toxine histolytique: le 5.° lot a servi de témoin. Les résultats sont résumés dans le tableau XI.

TABLEAU XI

ACTION CURATIVE DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU
CL. HISTOLYTICUM

Intervalles entre inoc. de toxine et les inj. de vit. C	Doses de toxine en D. M. M.	Doses de vit. C en mgs.	Nombre d'inoculés	Nombre de morts en 24 h.	% sur 24 h.	Nombre de morts en 48 h.	[illegible]
1 heure	1 D.M.M.	25	5	1/5	80%	2/5	60
1 heure	2 D.M.M.	25	5	4/5	20%	2/5	[illegible]
2 heures	1 D.M.M.	25	5	2/5	60%	4/5	20%
2 heures	2 D.M.M.	25	5	3/5	40%	5/5	0%
5 heures	1 D.M.M.	25	5	2/5	60%	2/5	60%
1 et 3 heures	1 D.M.M.	10-10	5	0/5	100%	3/5	40%
1 et 3 heures	2 D.M.M.	10-10	5	5/5	0%	5/5	0%
—	1 D.M.M.	T	10	6/10	40%	6/10	40
—	2 D.M.M.	T	10	10/10	0%	10/10	0%

NOTE: Il n'y a pas eu d'alteration après 48 heures d'observation.

Les résultats sont restés les mêmes après 48 heures d'observation.

Action neutralisante. — Nous avons tâché d'établir: 1.°) si la vitamine C neutraliserait la toxine du B. histolyticus; 2.°) si cette action neutrasilante obérait

à la loi des proportions multiples; 3.°) si le temps de contact exercerait quelque influence sur le pouvoir neutralisant.

La toxine du B. histolyticus a été mise en contact avec une D.M.M. de vitamine C, pendant 30 min. a 37°, dans une autre série d'essais une et deux D.M.M. de toxine ont été laissées en contact pendant 60 min. a 30°, respectivement avec 10 et 25 mgr. de toxine.

TABLEAU XII

ACTION NEUTRALISANTE DE LA VITAMINE C SUR LA TOXINE DU CL. HISTOLYTICUM

Temps de contact	Doses de toxine en D. M. M.	Doses de vit. C en mgs.	Nombre d'inoculés	Nombre de morts en 24 h.	% sur 24 h.	Nombre de morts en 48 h.	% sur 48 h.
30 minutes	1 D.M.M.	10	5	1/5	80%	1/5	80%
30 minutes	1 D.M.M.	25	5	1/5	80%	1/5	80%
30 minutes	2 D.M.M.	10	5	1/5	80%	3/5	40%
30 minutes	2 D.M.M.	25	5	3/5	40%	4/5	20%
60 minutes	1 D.M.M.	10	10	0/10	100%	1/10	90%
60 minutes	2 D.M.M.	25	10	7/10	30%	9/10	10%
—	1 D.M.M.	T	11	4/11	63,6%	6/11	45,4%
—	2 D.M.M.	T	12	10/12	16,6%	10/12	16,6%

NOTE: Il n'y a pas eu d'altération après 48 heures d'observation.

Les résultats sont résumés dans le tableau XII.

Conclusions. — 1) La vitamine C (acide 1-ascorbique) semble augmenter la résistance organique des animaux, qui deviennent moins sensibles à une et deux D.M.M. de toxine du B. histolyticus.

2) La vitamine C exerce une action curative contre une D.M.M. de toxine. Cette action ne se manifeste qu'une heure après l'injection de toxine. Au bout de 2 heures, elle devient inégale. Des doses répétées de 10 mgr. de vitamine C à des intervalles d'une et trois heures après l'injection d'une et deux D.M.M. n'exercent point d'action curative sur la toxine du B. histolyticus.

3) La vitamine C parait avoir sur la toxine du B. histolyticus une action neutralisante, qui ne suit pas la loi des proportions multiples. Le temps de contact n'augmente pas le pouvoir neutralisant de la vitamine sur la toxine.

Nous n'avons pas vérifié si les mélanges neutralisants sont antigéniques. Des doses de 10 mgr. de vitamine C semblant avoir sur deux D.M.M. de toxine du B. histolyticus une action inactivante plus grande que des doses de 25 mgr. Il parait dons y avoir une zone optima de neutralisation.

BIBLIOGRAFIA

1 — *Harde, E.* — Acide ascorbique (vitamine C) et intoxications — C. R. Acad. Sc. 199 (13) :618.1934.

2 — *Harde, E. & Philippe, M.* — Observations sur le pouvoir antigène du mélange toxine diphterique et vitamine C — C. R. Acad. 199(16) :739.1934.

3 — *Harde, E. & Greewall, C. K.* — Vitamine C, and diphteric toxine — Proc. of the Soc. for Exp. Biol. and Med. 32(7) :1157.1935.

4 — *Jungeblut, C. W. & Zwemer, R.* — Inactivation of diphterie toxine *in vivo* and *in vitro* by crystalline Vitamin C (ascorbic acid) — Proc. of the Soc. for Exp. Biol. and Med. 32(8) :1229.1935.

5 — *Grooten, O. & Bezssonoff, N.* — Action de la vitamine C sur la toxine diphterique sensibilité du bacille de la coqueluche vis-à-vis de l hydroquinol et de la vitamine C — Ann. Inst. Pasteur 56(4) :413.1936.

6 — *Zilva, S. S.* — The alleged antitoxine action of vitamin C in diphterie — Brit. J. of Exp. Path. 18(6) :440.1937.

7. *Jungebult, W. C.* — Inactivation of tetanus toxine by crystall'ne vitamin C (ascorbic acid) — J. of. Immunology 33(3) :203.1937.

8 — *Schulze, E. & Hecht, U.* — Uber die Wirkung der Ascorbinsäure auf Diphterie — Formoltoxoid und Testanustoxin — Klin. Wschr. 16(42) :1460.1937.

9 — *Dieckoff, J.* — Diphterie Formoltoxoid und Ascorbinsäure — Klin. Wschr. 16(42) : 1463.1937.

10 — League of Nations — Health Organization Permanent Commission on Biological Standardization — Geneve, C.M./c.P.S.B/23. 1925.

11 — *Rohmer, P.; Bezssonoff, N.; Stoerr, E. & Perrier, I.* — La teneur en vitamine C su sang et des urines après injections massives — C. R. Soc. Biol. 118(11) :1090-1935.

12 — *Barron, G.; De Meio, R. H. & Klemperer, F.* — Cooper and hemochromogens as catalists for the oxydation of ascorbic acid. The Mechanism of the oxydation — J. Biol. Chem. 17 :625.1914.

13 — *Mawson, C. A.* — The influence of animal tissues on the oxydation of ascorbic acid — Bioch. J. 29(3) :569.1935.

14 — *Kellie, A. E. & Zilva, S. S.* — The catalytic oxydation of ascorbic acid — Bioch. J. 29(5) :1028.1935.

15 — *Lyman, C. M.; Schulze, M. O. & King, C. G.* — The effect of meta-phosphoric acid and some other inorganic acids on the catalytic of ascorbic acid — J. Biol. Chem. 118(3) :757.1937.

16 — *Hartley, P. & White, P. B.* — Étalon international proposé pour le sérum antivibrion septique. — Bull. Trimestriel de l'organization d'Hyg'ene — No. especial 13.1935.

17 — *Bengston, I. A.* — The official United States and International Unit for standardizing gas gangrene antitoxin (Vibrion septique). — Publ. Health Reports. 49(52) :1557. 1934.

18 — *Walbum, L. R. & Reymann, C.* — Étalon International proposé pour le sérum anti-oedematiens — Bull. Trimestriel de l'Organisation d'Hygiene — No. especial: 42.1935.

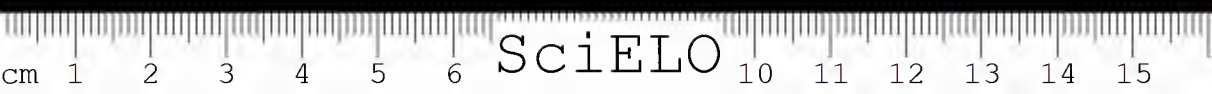
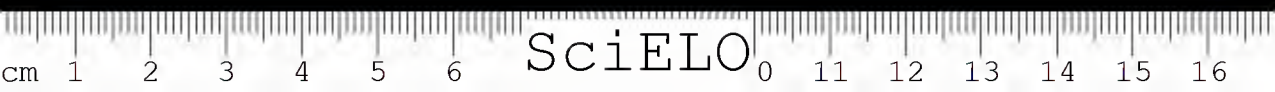
19 — *Bengston, I. A.* — The official United States and International Unit for standardizing gas gangrene antitoxin (*oedematiens*) — Publ. Health Reports **51**(5):526.1937.

20 — *Grotova, H. W.* — Étude comparé des sérums étalons antigangreneux internationaux et soviètique — Ann. Inst. Pasteur **59**(5):526.1937.

21 — *Walbum, L. E. & Reymann, C.* — Memorandum concerning a proposed international standard for gas gangrene antitoxin (*histolyticum*) Dept. of Biol. Standards H. I. M. 1,35 Copenhagen, 1935.

22 — *Bengston, I. A.* — The official United States and International Unit for standardizing gas gangrene antitoxin (*histolyticum*) — Publ. Health Reports **51**(37):1263.1936.

(Publicado *in* Compt. Rend. Soc. Biol. *129* (24, 31). 1938 e *in* Brasil-Medico *52* (26, 27, 28 e 29). 1938. Comun. Sociedade de Medicina e Cirurgia do Rio de Janeiro em Abril de 1938).

599.32:616.831

COMPORTAMENTO DA COBAIA *(CAVIA PORCELLUS L.)* E DO PREÁ *(CAVIA RUFESCENS* LUND*)* EM RELAÇÃO AOS ANTIGENOS TETANICOS

POR

ARIOSTO BÜLLER SOUTO & GERTRUD VON UBISCH

Na verificação do poder antigenico da anatoxina tetanica e no doseamento do sôro antitetanico, em unidades americanas conforme processo em uso no Instituto Butantan, são, por sua sensibilidade, utilizadas as cobaias.

Conforme estatuiram ROSENAU e ANDERSON (24), o poder protetor de uma antitoxina tetanica é avaliado pela menor quantidade dessa antitoxina necessaria para proteger a vida de uma cobaia de 350 gs. durante 96 horas contra a dose de prova de toxina padrão.

Para uma apreciação segura dos resultados dos doseamentos é necessario que a variação individual nas reações imunologicas dos lotes de cobaias usados seja de fraca amplitude. Os lotes de cobaias, pois, devem ser padronizados tanto quanto possivel. A este respeito escrevem DREIFUS e LESNÉ (8) que "Chez les animaux plus petits qui servent aux experiences de laboratoire, la determination exacte des propriétés d'immunité ou de sensibilité vis-a-vis de certaines affections a un intérêt indiscutable. Il faut, en effect, se méfier habituellement des variations individuelles et on conçoit sans peine l'nterêt, lors des dosages de toxicité et de telle sorte que leurs reactions soient comparables les unes aux autres". IRWIN (14) estabelece tambem que "In all experiments dealing with the *inter-reaction* of pathogenic bacteria and their host, almost the most desirable characteristic in the studies, and one most difficult to obtain, is the uniformity reacting strain in the animals".

WILSON (36) assim se refere às multiplas dificuldades na obtenção de reações uniformes: "The standardisation of the dosage within reasonable limits presents little difficulty, but the selection of animals of uniform resistance presents a problem that at the moment appears frankly insoluble".

Esta resolução, porém, parece ser dada teoricamente ao menos, nos postulados de PERRIN e CUÉNOT (23): "Si une experience peut etre absolutement précise, le protocole devra non seulement specifier le produit inoculé, mais aussi indiquer la nature du "terrain" que le reçoit. La création d'une ou plusieurs races homozygotes de Cobaye, c'est-à-dire de formule génétiques constantes est une necessité, tant qu'elle ne será pas réalisée, il sera impossible de répéter plusieurs fois une meme experience de façon identique. La seule ressource que nous possédons actuellement est de multiplier les experiences pour obtener des moyennes sérieuses". Estes autores assinalam a grande resistencia das cobaias albinas à toxina tetanica, informando que uma dose de toxina tetanica que mata as cobaias pigmentadas em menos do que 85 horas é tolerada perfeitamente pelas albinas. Ao contrario de tal afirmativa NICOLLE e RAMON (22) antes ja haviam verificado serem os albinos menos resistentes ás toxi-infecções. Tais verificações foram confirmadas por LÉMÉTAYER (20), o qual, inoculando 1 D.M.L. de toxina tetanica nos musculos da coxa de 131 cobaias albinas e em igual numero de cobaias pigmentadas, poude confirmar tal resultado. A discrepancia entre os resultados de LÉMÉTAYER, NICOLLE e RAMON, dum lado, e os de PERRIN e CUÉNOT, de outro, talvez tenha por causa o fato de poderem ser isoladas raças albinoticas de raças pigmentadas, diversamente suscetiveis. Sabemos, com efeito, que a mutação "albino" é a mais frequente, pois ocorre em quasi todas as especies de animais.

O peso-padrão de 350 gs. fornece nova fonte de engano dado que uma raça atinge este peso mais cedo, outra mais tarde, como tambem assinala IRWIN (16 escrevendo: "Weight in itself is determined largely by hereditary factors". Este dado poude por nós ser confirmado: Trabalhamos no Instituto Butantan com três raças diferentes de cobaias, denominadas: Butantan, Faculdade de Medicina e Alemanha. A raça "Butantan" é uma "população" no sentido genetico, tendo se originado dum cruzamento iniciado ha cerca de 13 anos. A raça "Faculdade de Medicina" originou-se, inicialmente, de 6 cobaias fornecidas gentilmente pelo Prof. Paulo Sawaya, tendo a creação aumentado no decurso de 1 ano e meio. Finalmente, é uma "raça pura" no sentido genetico, obtida pela gentileza do Prof. Kroening do Instituto de Zoologia Goettingen e aumentada tambem no Butantan. A seguinte tabela dá o numero de dias necessarios para que animais destas três raças atinjam o peso-padrão de 350 gs.:

QUADRO I

Proveniencia	Idade minima	Idade maxima	Amplitude de variação
Butantan	18 dias	62 dias	44 dias
Faculdade	32 "	61 "	29 "
Alemanha	34 "	53 "	19 "

Certa amplitude de variação não pode ser eliminada, considerando que o numero diferente de filhotes numa ninhada tem influencia com o peso dos animais nos primeiros mêses da vida, a não ser que só se usem animais provenientes duma ninhada certa.

Devemos admitir ainda que a faculdade de imunização e as outras propriedades do sangue dos roedores dependem não só do peso, mas tambem da idade.

Enquanto as variações devidas á existencia de animais não uniformes geneticamente, não podem ser eliminadas sinão pela criação de raças puras, outras como por exemplo a falta de uniformidade do meio ambiente podem ou elimina-las ou toma-las em consideração.

HERWICK, WEIR e TATUM (13) acharam que a cobaia é mais suscetivel á toxina tetanica durante o verão e menos suscetivel durante o inverno, ao contrario, justamente, do que havia sido notado por GLENNY e SUEDMERSEN (11) e outros (3) em relação á toxina difterica, a qual é mais toxica para a cobaia no inverno do que no verão. Desejamos mencionar tais observações só para esclarecer o assunto, pois, nosso fim nesta serie de experiencias é estudar as diferenças imunologicas de certas especies de cobaias. Existindo no Bioterio do Instituto Butantan um grande numero de cobaias hibridisadas com preás, resolvemos investigar si os preás puros (e no caso afirmativo os hibridos preás-cobaias) se comportavam igualmente como as cobaias puras nos doseamentos da toxina tetanica e na resposta á solicitação antigenica, isto é, si tinham a mesma resistencia ou a mesma suscetibilidade e o mesmo carater reativo ao antigeno tetanico. Esta questão apresentava para nós uma importancia particularmente especial, por haver neste Instituto já sido verificado (33) que as cobaias têm diversa capacidade de reação em face do antigeno difterico.

ANIMAIS USADOS

Os animais de experiencia eram preás puras e cobaias do bioterio do Instituto Butantan e da Faculdade de Medicina de São Paulo (os animais acima mencionados recebidos da Alemanha não tinham multiplicado ainda bastante para serem usados). Nesta primeira prova, feita apenas para orientação não usámos hibridos, pois precisavamos em primeiro lugar verificar si havia diferença fisiologica entre as duas especies *Cavia porcellus* e *Cavia rufescens*. No caso afirmativo deviamos repetir a esperiencia com hibridos de conhecida porcentagem de sangue preá em relação á cobaia. Neste caso, a palavra "sangue" está empregada no sentido figurado, usual na criação de animais, como se dá no exemplo seguinte:

Cobaia ♀ × Preá ♂ = ½ sangue cobaia e ½ sangue preá.

(Cobaia ♀ × Preá ♂) × Preá ♂ = (quer dizer uma femea da primeira geração de cruzamento entre cobaias e preás cruzada com um *preá puro*) = ¼ sangue sangue cobaia e ¾ sangue preá.

♀

(Cobaia ♀ × Preá ♂) × Cobaia ♂ = (quer dizer uma femea da primeira geração de cruzamento entre cobaias e preás cruzada com um *cobaio puro*) = ¾ sangue cobaia e ¼ sangue preá.

♀

Os animais com pouco sangue preá eram para nós os mais interessantes em relação ao cruzamento que vem sendo efetuado ha cerca 13 anos no bioterio de Butantan. O fato de encontrarmos frequentemente animais dando reação imunologica diversa (ver paginas 27 e 28) do que era para esperar, justificava, de antemão, a suspeita de apresentarem as referidas especies diferenças imunologicas notaveis.

QUADRO II

Animais usados na primeira experiencia (Começo 20.V.1937)

No.	*Provenienc ia*	*Cor*	*Pelagem*	*Cranio*	*Peso inicial*	*Especie*
7	Pindamonhangaba	cotia	lisa	tipico	300 gs.	Préa
31	"	"	"	"	400 "	"
304	Fazenda Butantan	"	"	"	350 "	"
238	" "	"	"	"	370 "	"
232	Ribeirão Pires	"	"	"	350 "	"
311	Fac. de Medicina	preta-amarela	lisa	tipico	290 gs.	Cobaia
312	" "	"	"	"	265 "	"
313	" "	"	"	"	280 "	"
262	Bioterio Butantan	branca-crespa	"	aberrante	680 "	"
295	" "	branca	"	pouco aberrante	440 "	"
251	Fac. de Medicina	branca-amarel. preto	"	tipico	710 "	"

Fig. I

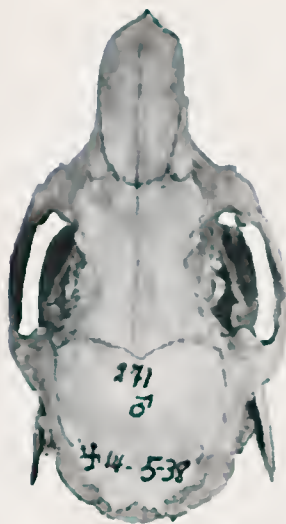
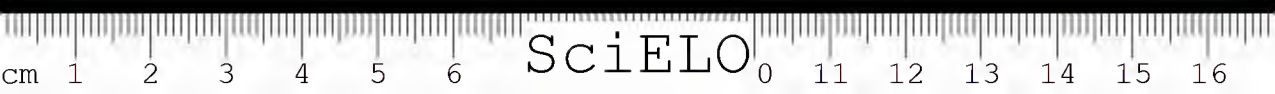
Cobaia tipica.
Lote I.

Fig. II

Preá tipico.
Lote II.

Fig. III

No. 125 — Hibrido.
Quadro XXXIV.

Fig. IV

Hibrido.
Lote II.

QUADRO III

Animais usados na segunda experiencia (Começo 4.VII.1937)

No.	Proveniencia	Cor	Pelagem	Craneo	Peso inicial	Especie
15	Pindamonhangaba	cotia	lisa	tipico	360 gs	Preá
20	"	"	"	"	240 "	"
28	"	"	"	"	290 "	"
37	Nascido em cativeiro	"	"	"	185 "	"
303	Fazenda Butantan	"	"	.	285 "	"
271	Faculd. Medicina	branca-amarela	lisa	naso frontal preá front. pariet. cobaia	910 gs.	Cobaia
273	" "	"	crespa	tipica	685 "	"
274	" "	"	"	"	655 "	"
308	" "	"	lisa	"	310 "	"
329	Bioterio Butantan	"	"	"	365 "	"

Todos os animais de experiencia eram machos

QUADRO IV

Animais usados na terceira experiencia (Começo 4.II.1938)

No.	Proveniencia	Cor	Pelagem	Craneo	Peso inicial	Especies
23	Animais da 2.ª	cotia	lisa	tipica		Preá
303	Experiencia	"	"	"	295 gs.	"
271	"	branca-amarela	"	mestiço	1.145 "	Cobaia
273	"	"	crespa	tipico	830 "	"
329	"	"	"	"	910 "	"
267	Vila Gomes	cotia	lisa	tipica	365 gs.	Preá
287	Agua Branca	"	"	"	440 "	"
	(?)	"	"	"	365 "	"
463	Bioterio Butantan	branco-amar.-cotia	"	"	340 "	Cobaia
469	" "	branco-amar.-preto	"	"	360 "	"
470	" "	amarelo-preto	"	"	380 "	"
471	" "	branco-amar.-preto	"	aberrante	330 "	"

METODOS

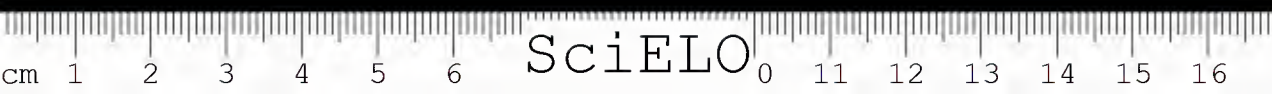
a) *Animais de experiencia* — Foram utilizados 3 lotes de animais (vide quadro II-IV): o 1º lote de 5 preás e 6 cobaias recebeu 28 unidades floculantes de anatoxina; o 2º lote de 5 preás e 5 cobaias, recebeu 70 unidades floculantes de anatoxina; o 3º lote de 3 preás e 4 cobaias, serviu para verificar, si os preás eram mais resistentes do que as cobaias na ausencia de qualquer imunização anterior; e mais dois preás e três cobaias do 2º lote, para controlar o poder protetor decorrente da imunização efetuada.

b) *Antigeno* — Foi usada uma anatoxina preparada no Instituto Butantan com 7 unidades floculantes por cc. em relação a um sôro antitetanico padrão que gentilmente nos enviou o professor *Ramon* do Instituto Pasteur de Paris. Cobaias puras inoculadas com 10 ccs. desta anatoxina ficaram, ao fim de um mês aptas, a resistir a inoculação de 100 D.M.L. de toxina tetanica.

c) *Dóses* — Os animais foram inoculados por via hipodermica: o 1º lote recebeu inicialmente 1 cc. de anatoxina ou sejam 7 unidades floculantes e depois de 7 dias, mais 3 ccs. de anatoxina ou sejam 21 unidades floculantes num total de 28 unidades floculantes. O 2º lote recebeu 3 ccs. de anatoxina ou sejam 21 unidades floculantes e uma semana depois, mais 7 ccs. ou sejam 49 unidades floculantes num total de 10 ccs. ou sejam 70 unidades floculantes.

d) *Sangrias* — Foram feitas sangrias iniciais em todos animais afim de se verificar si possuiam antitoxina de origem natural. O 1º lote sofreu sangrias 10, 20, 50, 70, 100, 130, 150 e 190 dias após a ultima injeção de anatoxina. O 2º lote sofreu sangrias 10, 30, 50, 80, 100, 130, 150 e 180 dias após a ultima inoculação.

e) *Tecnica de doseamento* — Na avaliação do crescimento da curva antitoxica utilizamos o metodo estabelecido por *Tenbrock* e *Bauer* (28-31).

1º *Antigeno usado no doseamento* — Toxina tetanica seca, obtida por precipitação, pelo sulfato de amonio, do filtrado isento de germes de uma cultura de 8 dias de *Clostridium tetani* em caldo-coração-de-vitela, glicosado, com pedaços de figado (semeadura de amostras conservadas desde 1931). O filtrado inicialmente seco em vacuo sulfurico, foi conservado em secador Hempel em presença de cloreto de calcio e anidrido pentafosforico. A toxina, triturada em gral, tamisada e conservada, sob anidrido pentafosforico, posto em um dos ramos de tubos em U de cor ambar e no outro a toxina; aspiração pelo vacuo de uma corrente de ar seco pelo cloreto de calcio. Durante todo tempo de nossos trabalhos a D.M.L. desta toxina foi 0,000005 gs.. Todas as aferições foram controladas com 1 e 2 D.M.L.. A morte dos testemunhos ocorreu dentro de um prazo medio de 84-108 hs. com 1 D.M.L. e com 36 a 50

hs. com 2 D.M.L.. Em virtude das fracas variações observadas no tempo da morte dos testemunhos nos quadros dos doseamentos, não foram registados os testemunhos feitos paralelamente a cada aferição dos soros.

2º *Animais empregados nos doseamentos* — Empregamos camondongos brancos, tanto quanto possivel da mesma geração e com o peso uniforme de 30 gs. A cada serie de inoculações correspondem sempre testemunhos paralelos.

3º *Tecnica* — Era posto em contacto 0,1 cc. de sôro dos animais de experiencia com D.M.L. variaveis, completado o volume para 2 ccs. com salina a 8% e pH = 7.0. As misturas eram levadas á estufa a 37°C por 30 minutos e, em seguida, inoculadas nos *camondongos por via subcutanea, perto da cauda.* Estas inoculações foram feitas de colaboração com a Senhorinha Chloé de Lima, a quem apresentamos os nossos agradecimentos, que fazemos extensivos, tambem, á Senhorinha Emma de Lima.

QUADRO V

Resultados obtidos nos doseamentos das sangrias preliminares em animais pertencentes ao 1.º lote

No. do animal	Data da prova	Toxina		Camondongo	
		em mg.	em D. M. L.	Peso	Resultado
P. 31	7. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	M. 50 hs.
	7. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 42 hs.
P. 238	7. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S.
	7. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 50 hs.
P. 304	7. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	M. 84 hs.
	7. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 50 hs.
P. 7	7. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	M. 50 hs.
	7. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 36 hs.
P. 232	7. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	M. 50 hs.
	6. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 36 hs.
C. 263	7. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	M. 50 hs.
	7. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 43 hs.
C. 313	7. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	M. 96 hs.
	7. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 96 hs.
C. 251	7. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	M. 84 hs.
	7. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 36 hs.
C. 295	7. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	M. 84 hs.
	7. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 43 hs.
C. 311	7. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	M. 84 hs.
	7. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 50 hs.
C. 312	7. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	M. 84 hs.
	7. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 36 hs.

1ª sangria — Esta sangria foi feita inicialmente antes de terem os animais d experiencia recebido o antigeno. Verifica-se do quadro acima que nenhum dos animais de experiencia apresentou imunidade natural, pois 0,1 de seu sôro protegeu um camondongo de 30 gs. contra 0,000005 de toxina, ou seja contra 1 D.M.L.. Esta preá foi tambem aquela cujo sôro atingiu um titul antitoxico mais elevado no decorrer da imunização.

QUADRO VI

Resultado dos doseamentos 10 dias após a inoculação de 28 unidades floculantes de anatoxina tetanica

No. do animal	Data da prova	Toxina		Camondongo	
		em Mg.	em D. M. L.	Peso	Resultado
P. 31	15. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S.
	15. VI. 937	0,01	2 D. M. 1	30	M. 132 hs.
P. 238	15. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S.
	15. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	S.
	24. VI. 937	0,025	5 D. M. L.	30	(1)
P. 304	15. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	M. 84 hs.
	15. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 67 hs.
P. 7	15. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	M. 50 hs.
	15. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 84 hs.
P. 232	15. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	M. 50 hs.
	15. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 50 hs.
P. 262	15. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S.
	15. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 132 hs.
C. 313	15. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S.
	15. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	S.
C. 251	15. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S.
	15. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 132 hs.
C. 295	15. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S.
	15. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	S.
C. 311	15. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	M. 108 hs.
	15. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 89 hs.
C. 312	15. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S
	15. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 84 hs.

(1)

2ª sangria — Esta sangria foi praticada 10 dias após a 2ª inoculação de anato xina tetanica. Verifica-se do quadro acima que 2 dos preás inoculados já começavam a apresentar uma fraca imunidade, ocorrendo o mesmo nas co baias, cujo grau de imunidade era ligeiramente maior.

QUADRO VII

Resultado dos doseamentos 20 dias após a inoculação de 28 unidades floculantes de anatoxina tetanica

No. do animal	Data da prova	Toxina		Camundongo	
		em Mg.	em D. M. L.	Peso	Resultado
P. 304	24. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	M. 96 hs.
	24. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 84 hs.
	24. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S.
P. 238	24. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	S.
	4. I. 937	0,05	10 D. M. L.	30	M. 60 hs.
	2. II. 937	0,10	20 D. M. L.	30	M. 60 hs.
	2. II. 937	0,25	50 D. M. L.	30	M. 60 hs.
	2. II. 937	0,50	100 D. M. L.	30	M. 60 hs.
P. 232	24. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	M. 50 hs.
	24. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 50 hs.
	4. I. 937	0,005	1 D. M. L.	30	M. 50 hs.
P. 7	24. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	M. 84 hs.
	24. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 108 hs.
P. 31	24. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S.
	24. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 84 hs.
C. 311	24. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	M. 132 hs.
	24. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 84 hs.
C. 312	24. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S.
	24. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	S.
C. 313	24. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S.
	24. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 84 hs.
	4. I. 937	0,05	10 D. M. L.	30	M. 60 hs.
C. 295	24. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S.
	24. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 96 hs.
	4. I. 937	0,05	10 D. M. L.	30	M. 84 hs.
C. 251	24. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S.
	24. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	S.
C. 262	24. VI. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S.
	24. VI. 937	0,01	2 D. M. L.	30	S.
	4. I. 938	0,05	10 D. M. L.	30	S.

3ª sangria — Esta sangria foi praticada 20 dias após a 2ª inoculação de antigeno. Verifica-se que o resultado das aferições, praticadas 20 dias após terem os animais de esperiencia recebido a 2ª dose de antigeno, pouco diferem dos obtidos nas sangrias feitas com intervalo de 10 após a 2ª dose.

QUADRO VIII

Resultado dos doseamentos 50 dias após a inoculação de 28 unidades floculantes de anatoxina tetanica

No. do animal	Data da prova	Toxina		Camondongo	
		em Mg.	em D. M. L.	Peso	Resultado
P. 31	23. VII. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S.
	23. VII. 937	0,01	2 D. M. L.	30	S.
	23. VII. 937	0,025	5 D. M. L.	30	S.
	4. I. 938	0,25	50 D. M. L.	30	S.
P. 238	23. VII. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S.
	23. VII. 937	0,01	2 D. M. L.	30	S.
	23. VII. 937	0,025	5 D. M. L.	30	S.
	4. I. 938	0,05	10 D. M. L.	30	S.
	4. I. 938	0,10	20 D. M. L.	30	S.
	4. I. 938	0,25	50 D. M. L.	30	S.
	2. II. 938	0,50	100 D. M. L.	30	S.
P. 304	23. VII. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S.
	23. VII. 937	0,01	2 D. M. L.	30	S.
	23. VII. 937	0,025	5 D. M. L.	30	S.
	4. I. 938	0,10	20 D. M. L.	30	M. 108 hs.
P. 232	23. VII. 937	0,005	1 D. M. L.	30	M. 50 hs.
	23. VII. 937	0,005	2 D. M. L.	30	M. 50 hs.
	23. VII. 937	0,025	5 D. M. L.	30	M. 50 hs.
P. 262	23. VII. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S.
	23. VII. 937	0,01	2 D. M. L.	30	S.
	23. VII. 937	0,025	5 D. M. L.	30	S.
	4. I. 938	0,05	10 D. M. L.	30	S.
	4. I. 938	0,10	20 D. M. L.	30	S.
	4. I. 938	0,25	50 D. M. L.	30	S.
	4. I. 938	0,50	100 D. M. L.	30	M. 108 hs.
C. 313	23. VII. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S.
	23. VII. 937	0,01	2 D. M. L.	30	S.
	23. VII. 937	0,025	5 D. M. L.	30	S.
	4. I. 938	0,25	50 D. M. L.	30	S
	2. II. 938	0,50	100 D. M. L.	30	S.

QUADRO VIII (Continuação)

Resultado dos doseamentos 50 dias após a inoculação de 28 unidades floculantes de anatoxina tetanica

No. do animal	Data da prova	Toxina		Camondongo	
		em Mg.	em D. M. L.	Peso	Resultado
C. 251	23. VII. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S.
	23. VII. 937	0,01	2 D. M. L.	30	S
	23. VII. 937	0,025	5 D. M. L.	30	S
	4. I. 938	0,05	10 D. M. L.	30	S.
	4. I. 938	0,10	20 D. M. L.	30	S.
	4. I. 938	0,25	50 D. M. L.	30	S.
	2. II. 938	0,40	80 L. M. L.	30	S.
	2. II. 938	0,50	100 D. M. L.	30	S.
	2. II. 938	1,00	200 D. M. L.	30	S
C. 295	23. VII. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S.
	23. VII. 937	0,01	2 D. M. L.	30	S.
	23. VII. 937	0,025	5 D. M. L.	30	S.
	4. I. 938	0,05	10 D. M. L.	30	S.
	4. I. 938	0,10	20 D. M. L.	30	S
	4. I. 938	0,25	50 D. M. L.	30	S.
C. 311	23. VII. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S.
	23. VII. 937	0,01	2 D. M. L.	30	M. 108 hs.
	23. VII. 937	0,025	5 D. M. L.	30	M. 108 hs.
C. 312	23. VII. 937	0,005	1 D. M. L.	30	S
	23. VII. 937	0,01	2 D. M. L.	30	S.
	23. VII. 937	0,025	5 D. M. L.	30	S
	4. I. 938	0,05	10 D. M. L.	30	S.
	4. I. 938	0,10	20 D. M. L.	30	S.
	4. I. 938	0,25	50 D. M. L.	30	S.

2ª sangria — Esta sangria foi praticada 50 dias após a 2ª inoculação de anatoxina tetanica. Verifica-se, em comparação com os resultados do quadro VII, uma diferença notavel, exceto quanto ao preá n.º 232, que não se imunizou. todos os preás como as cobaias mostraram clara resposta á solicitação antigenica por meio de 28 unidades floculantes de anatoxina tetanica. Somente um preá continuava a não apresentar resposta á solicitação antigenica, outros eram protegidos contra mais de 200 D.M.L.

QUADRO IX

Resultado dos doseamentos 70 dias após a inoculação de 28 unidades floculantes de anatoxina tetanica

No. do animal	*Data da prova*	*Toxina*		*Camondongo*	
		em Mg.	*em D.M.L.*	*Peso*	*Resultado*
P. 31	12. VIII. 37	0,25	50 D. M. L.	30	S.
	12. VIII. 37	0,50	100 D. M. L.	30	S.
	4. I. 38	0,75	150 D. M. L.	30	S.
	12. VIII. 37	0,25	50 D. M. L.	30	S.
P. 238	12. VIII. 37	0,50	100 D. M. L.	30	S.
	4. I. 38	0,75	150 D. M. L.	30	S.
	4. I. 38	1,00	200 D. M. L.	30	M. 108 hs.
	12. VIII. 37	0,25	50 D. M. L.	30	M. 84 hs.
P. 304	12. VIII. 37	0,50	100 D. M. L.	30	M. 36 hs.
	4. I. 38	0,10	20 D. M. L.	30	S.
	22. XII. 37	0,005	1 D. M. L.	30	M. 86 hs.
P. 232	12. VIII. 37	0,25	50 D. M. L.	30	M. 30 hs.
	12. VIII. 37	0,50	100 D. M. L.	30	M. 36 hs.
	12. VIII. 37	0,25	50 D. M. L.	30	S.
C. 262	12. VIII. 37	0,50	100 D. M. L.	30	S.
	4. I. 38	0,75	150 D. M. L.	30	S.
	4. I. 38	1,00	200 D. M. L.	30	M. 72 hs.
	12. VIII. 37	0,25	50 D. M. L.	30	S.
	12. VIII. 37	0,50	100 D. M. L.	30	S.
C. 313	4. I. 38	0,75	150 D. M. L.	30	S.
	4. I. 38	1,25	250 D. M. L.	30	S.
	2. II. 38	1,50	300 D. M. L.	30	S.
	2. II. 38	2,00	400 D. M. L.	30	S.
	2. II. 38	2,50	500 D. M. L.	30	S.
C. 251	12. VIII. 37	0,25	50 D. M. L.	30	S.
	12. VIII. 37	0,50	100 D. M. L.	30	M. 84 hs.
C. 295	12. VIII. 37	0,25	50 D. M. L.	30	S.
	12. VIII. 37	0,50	100 D. M. L.	30	S.
	4. I. 38	0,01	2 D. M. L.	30	S.
C. 311	12. VIII. 37	0,05	10 D. M. L.	30	M. 84 hs.
	12. VIII. 37	0,250	50 D. M. L.	30	M. 84 hs.
C. 312	12. VIII. 37	0,25	50 D. M. L.	30	S.
	12. VIII. 37	0,50	100 D. M. L.	30	M. 84 hs.

5ª sangria — Esta sangria foi praticada 70 dias após terem os animais de experiencia sido injetados com 28 unidades de anatoxina tetanica. Verifica-se que a curva de formação de antitoxina continúa a subir. O sôro de uma das cobaias, na dose de 0,1 cc. protegeu o camondongo contra 2 mg. 50 ou sejam 500 D.M.L. de toxina.

QUADRO X

Resultado dos doseamentos 100 dias após a inoculação de 28 unidades floculantes de anatoxina tetanica.

No. do animal	*Data da prova*	*Toxina*		*Camondongo*	
		em Mg.	*em D.M.L.*	*Peso*	*Resultado*
P. 31	31.VIII.37	1,0	200 D.M.L.	30	M. 108 hs.
	31.VIII.37	1.5	300 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	2. II.38	1,75	350 D.M.L.	30	M. 60 hs.
	2. II.38	2,00	400 D.M.L.	30	M. 60 hs.
	2. II.38	2.50	500 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	2. II.38	3,00	600 D.M.L.	30	M. 36 hs.
P. 238	2. II.38	0.75	150 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	1,00	200 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	31.VIII.37	1,50	300 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	2. II.38	2.0	400 D.M.L	30	M. 48 hs.
P. 304	2. II.38	0.25	50 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	31.VIII.37	0,50	100 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	31.VIII.37	1.0	200 D.M.L.	30	M. 36 hs.
P. 232	31.VIII.37	0.005	1 D.M.L.	30	M. 86 hs.
	31.VIII.37	0,05	10 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	31.VIII.37	0.25	50 D.M.L.	30	M. 36 hs.
C. 262	31.VIII.37	1.0	200 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	1,5	300 D.M.L.	30	M. 108 hs.
C. 313	31.VIII.37	1.0	200 D.M.L.	30	M. accident
	31.VIII.37	1.5	300 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	2,0	400 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	2,5	500 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	4.0	800 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	5,0	1.000 D.M.L.	30	M. 108 hs.
C. 251	31.VIII.37	0,5	100 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	1,0	200 D.M.L.	30	M. 36 hs.
C. 295	31.VIII.37	1.00	200 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	31.VIII.37	1.50	300 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	2. II.38	0.75	150 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	0.05	10 D.M.L.	30	S.
C. 311	31.VIII.37	0,25	50 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	31.VIII.37	0.5	100 D.M.L.	30	S.
C. 312	31.VIII.37	1.0	200 D.M.L.	30	M. 36 hs.

sangria — Esta sangria foi praticada 100 dias após os animais de experiencia terem sido injetados com 28 unidades floculantes de anatoxina tetanica. Duas cobaias atingiram, neste intervalo, o maximo de sua curva antitoxica: a

C.313, cujo sôro, na dose de 0,1 cc. protegeu o camondongo contra mais de 800 e menos de 1.000 D.M.L.; e a 312 que protegeu contra um maximo de 150 D.M.L. A curva antitoxica nos preás exceto no preá 232, continuava a crescer.

QUADRO XI

Resultado dos doseamentos 130 dias após a inoculação de 28 unidades floculantes de Anatoxina Tetanica

No. do animal	*Data da prova*	*Toxina*		*Camondongo*	
		em Mg.	*em D.M.L.*	*Peso*	*Resultado*
P. 31	3.XI.37	1,50	300 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	1,75	350 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	2,00	400 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	25.XI.37	2,25	450 D.M.L.	30	M. 36 hs.
P. 238	3.XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	1,0	200 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	1,25	250 D.H.L.	30	S.
	25.XI.37	1,50	300 D.M.L.	30	S.
	2.II.38	1,75	350 D.M.L.	30	S.
	2.II.38	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	2.II.38	2,25	450 D.M.L.	30	M. 108 hs.
P. 304	2.II.38	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,40	80 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,50	100 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	M. 24 hs.
	25.XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	M. 24 hs.
P. 232	3.XI.37	0,025	2 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,010	5 D.M.L.	30	M. 48 hs.
C. 262	3.XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	1,25	250 D.H.L.	30	S.
	25.XI.37	1,50	300 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	1,75	350 D.M.L.	30	S.
	2.II.38	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	2.II.38	2,25	450 D.M.L.	30	S.
	2.II.38	2,50	500 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	3,00	600 D.M.L.	30	S.

QUADRO XI (Continuação)

Resultado dos doseamentos 130 dias após a inoculação de 28 unidades floculantes de anatoxina tetanica

No. do animal	Data da prova	Toxina		Camondongo	
		em Mg.	em D.M.L.	Peso	Resultado
C. 313	3.XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	1,25	250 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	1,75	350 D.M.L.	30	S.
	2.II.38	2.00	400 D.M.L.	30	M. 108 hs.
	2.II.38	2,50	500 D.M.L.	30	M. 108 hs.
	2.II.38	3,00	600 D.M.L.	30	M. 60 hs.
C. 251	3.XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	1,25	250 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	1.50	300 D.M.L.	30	S.
C. 295	3.XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	1.50	300 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	1.75	350 D.M.L.	30	M. 44 hs.
	25.XI.37	2,00	400 D.M.L.	30	M. 48 hs.
C. 311	3.XI.37	0.25	50 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0.50	100 D.M.L.	30	S.
C. 312	2.II.38	0.10	20 D.M.L.	30	S.
	2.II.38	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	2.II.38	0,50	100 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	M. 108 hs.
	3.XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	M. 108 hs.

7ª sangria — Esta sangria foi praticada 130 dias depois de terem os animais de experiencia sido injetados com 28 unidades floculantes de anatoxina tetanica. Três cobaias deste lote, nos. 262, 295 e 251, atingiram então o maximo de sua curva antitoxica, conferindo 0,1 cc. de seu sôro proteção ao camondongo contra 500, 80, 125 e 300 D.M.L., respectivamente. Verifica-se assim que diante de um estimulo antigenico fraco as cobaias se imunizam um pouco melhor e um pouco mais rapidamente do que os preás; estes, no entanto, apresentam uma media de imunização mais uniforme. A não imunização de um dos preás (n.º 232) indica que estes estudos precisam ser retomados, utilizando-se maior numero de animaes para experiencia. Um dos preás, o de n.º 238, que na sangria preliminar demonstrou possuir anticorpos naturais circulantes, foi o que melhor se imunizou.

QUADRO XII

Resultado dos doseamentos 150 dias após a injeção de 28 unidades floculantes de Anatoxina Tetanica

No. do animal	Data da prova	Toxina		Camondongo	
		em Mg.	em D.M.L.	Peso	Resultado
P. 31	2. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	S
	2. II.38	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	1,0	200 D.M.L.	30	M. 108 hs.
	27. XI.37	1,25	250 D.M.L.	30	M. 36 hs
	27. XI.37	1,50	300 D.M.L.	30	M. 36 hs
	27. XI.37	1,75	350 D.M.L.	30	M. 36 hs
P. 238	27. XI.37	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	27. XI.37	2,50	500 D.M.L.	30	M. 36 hs.
P. 304	27. XI.37	0,50	100 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	27. XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	M. 30 hs
P. 232	2. II.38	0,005	1 D.M.L.	30	M. 30 hs
	2. II.38	0,01	2 D.M.L.	30	M. 30 hs
	27. XI.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 36 hs
	27. XI.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 36 hs
C. 262	3.XII.37	1,50	300 D.M.L.	30	M. 60 hs.
	3.XII.37	1,75	350 D.M.L.	30	M. 36 hs
	27. XI.37	2,00	400 D.M.L.	30	M. 36 hs
	27. XI.37	2,25	450 D.M.L.	30	M. 24 hs
	27. XI.37	2,50	500 D.M.L.	30	M. 24 hs
C. 313	27. XI.37	0,25	50 D.M.L.	30	M. [illegible]
	27. XI.37	0,50	100 D.M.L.	30	M. 36 hs
	2. II.38	1,75	350 D.M.L.	30	M. [illegible] hs
C. 251	27. XI.37	0,75	350 D.M.L.	30	M. 50 hs
	27. XI.37	2,00	400 D.M.L.	30	M. 50 hs
	27. XI.37	2,25	500 D.M.L.	30	M. 36 hs
C. 295	2. II.38	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	1,50	300 D.M.L.	30	M. 60 hs
	27. XI.37	1,75	350 D.M.L.	30	M. [illegible] hs
	27. XI.37	2,00	400 D.M.L.	30	M. [illegible] hs
C. 311	27. XI.37	0,25	50 D.M.L.	30	M. 36 hs
	27. XI.37	0,50	100 D.M.L.	30	M. 36 hs
C. 312	2. II.38	0,50	10 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	0,25	50 D.M.L.	30	M. 15 hs
	2. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	M. 60 hs
	27. XI.37	0,50	100 D.M.L.	30	M. 36 hs
	27. XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	M. 36 hs

3ª sangria — Esta sangria foi praticada 150 dias após a injeção da 2ª dose de antigeno. Tanto nos preás, como nas cobaias, começou a decrescer a curva de imunização de anatoxina tetanica 5 mêses depois de terem estes animais recebido 28 unidades floculantes.

QUADRO XIII

Resultado dos doseamentos 190 dias após a injeção de 28 unidades floculantes de Anatoxina Tetanica

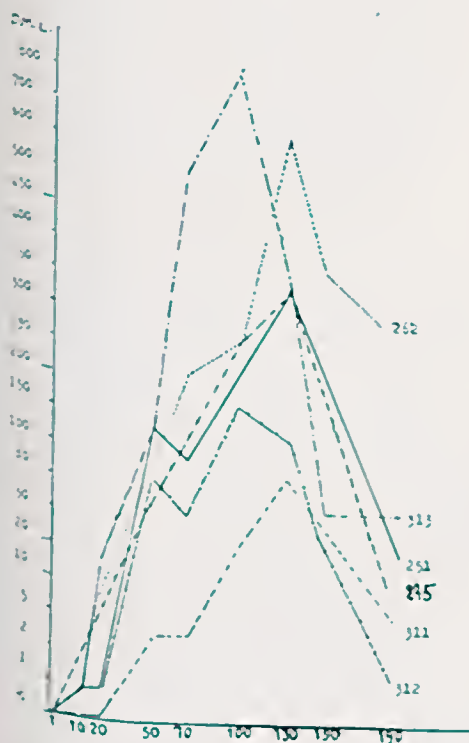
N. do animal	*Data da prova*	*Toxina*		*Camondongo*	
		em Mg.	*em D.M.L.*	*Peso*	*Resultado*
P 31	2. II.38	0,10	20 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	1,00	200 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	3.XII.37	1,50	300 D.M.L.	30	M. 36 hs.
P 238	2. II.38	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	1,50	300 D.M.L.	30	M. 48 hs.
	3.XII.37	1,50	300 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	3.XII.37	2,00	400 D.M.L.	30	M. 36 hs.
P. 304	2. II.38	0,05	10 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	0,1	20 D.M.L.	30	M. 60 hs.
	3.XII.37	0.125	25 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	3.XII.37	0.25	50 D.M.L.	30	M. 19 hs.
P 232	2. II.38	0.005	1 D.M.L.	30	M. 48 hs.
	2. II.38	0.01	2 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	3.XII.37	0.005	1 D.M.L	30	M. 50 hs.
	3.XII.37	0.01	2 D.M.L.	30	M. 36 hs.
C. 262	2. II.38	0.25	50 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	0.50	100 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	1.0	200 D.M.L.	30	S.
	22. II.38	1.25	250 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	0.50	300 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	3.XII.37	1.75	350 D.M.L.	30	M. 12 hs.
C 313	2. II.38	0,10	20 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	0.25	50 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	0.50	100 D.M.L.	30	M. 108 hs.
	3.XII.37	1.0	200 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	3.XII.37	1.50	300 D.M.L.	30	M. 36 hs.

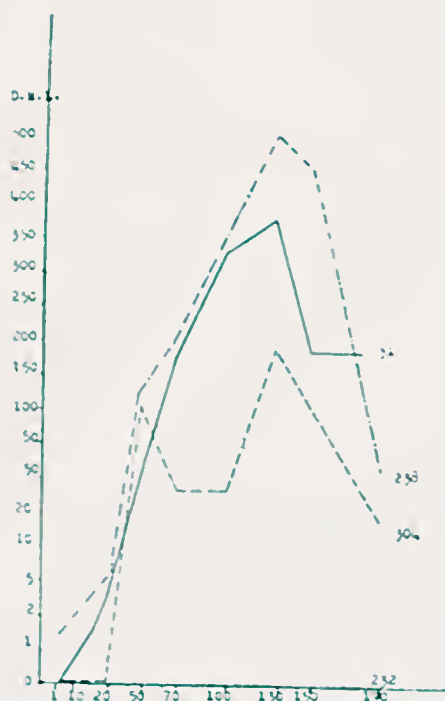
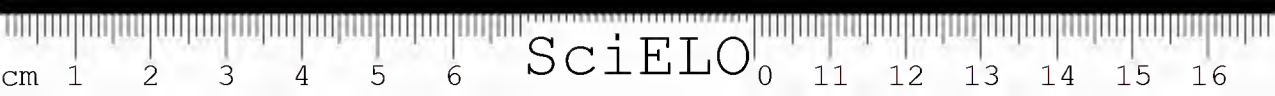
QUADRO XIII (Continuação)

Resultado dos doseamentos 190 dias após a injeção de 28 unidades floculantes de anatoxina tetanica

No. do animal	Data da prova	Toxina		Camondongo	
		em Mg.	em D.M.L.	Peso	Resultado
C. 251	2. II.38	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	1,0	200 D.M.L.	30	S.
C. 295	2. II.38	0,10	20 D.M.L.	30	M. 144 hs.
	2. II.38	0,25	50 D.M.L.	30	M. 72 hs.
	2. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	M. 24 hs.
	3.XII.37	1,00	200 D.M.L.	30	M. 12 hs.
	3.XII.37	1,50	300 D.M.L.	30	M. 12 hs.
C. 311	22. II.38	0,005	1 D.M.L.	30	S.
	22. II.38	0,01	2 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	0,025	5 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	0,05	10 D.M.L.	30	M. 60 hs.
	3.XII.37	0,125	25 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	3.XII.37	0,250	50 D.M.L.	30	M. 50 hs.
C. 312	22. II.38	0,005	1 D.M.L.	30	S.
	22. II.38	0,01	2 D.M.L.	30	M. 156 hs.
	22. II.38	0,025	5 D.M.L.	30	M. 156 hs.
	2. II.38	0,05	10 D.M.L.	30	M. 156 hs.
	2. II.38	0,10	20 D.M.L.	30	M. 108 hs.
	3.XII.37	0,125	25 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	3.XII.37	0,250	50 D.M.L.	30	M. 36 hs.

9ª sangria — Esta sangria foi praticada 190 dias após a injeção do antigeno. Verifica-se que a curva antitoxica continúa a declinar, atingindo limites inferiores, mais rapidamente nas cobaias do que nos preás: os preás demoram a se imunizar; imunizam-se menos fortemente mas seu sôro conserva um titulo antitoxico mais elevado e por mais tempo.

Graf. I

Curva de Imunização das cobaias que receberam 23 unidades floculantes de anatoxina tetanica.

Graf. II

Curva de imunização das preás que receberam 23 unidades floculantes de anatoxina tetanica.

QUADRO XIV

Resultados obtidos nos doseamentos de sangrias preliminares em animais pertencentes ao lote 2.°

No. do animal	*Data da prova*	*Toxina*		*Camondongo*	
		em Mg.	*em D.M.L.*	*Peso*	*Resultado*
P. 15	5.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	5.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 36 hs.
P. 20	5.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 48 hs.
	5.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 36 hs.
P. 28	5.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	5.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	acidente
P. 37	5.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 48 hs.
	5.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 48 hs.
P. 303	5.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 48 hs.
	5.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 48 hs.
C. 271	5.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	acidente
	5.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 50 hs.
C. 273	5.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 48 hs.
	5.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 48 hs.
C. 274	5.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	5.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 36 hs.
C. 308	5.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	5.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M 36 hs.
C. 329	5.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	5.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 36 hs.

Como na serie anterior, esta sangria foi feita preliminarmente, na ausencia de qualquer imunização, afim de se verificar si o sôro dos preás e das cobaias possuia antitoxina circulante de origem natural.

Nenhum dos animais mostrou possuir antitoxina natural, que, na dose de 0,1 cc. fosse suficiente para proteger a vida de camondongos inoculados contra 1 e 2 D.D.M.M.L.L. de toxina.

QUADRO XV

Resultado dos doseamentos 10 dias após a injeção de 70 unidades floculantes de Anatoxina Tetanica

No. do animal	Data da prova	Toxina		Camondongo	
		em Mg.	*em D.M.L.*	*Peso*	*Resultado*
P. 15	23.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	S.
	23.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	S.
P. 20	23.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	S.
	23.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	S.
P. 28	23.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 32 hs.
	23.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 84 hs.
P. 37	23.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	23.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 50 hs.
P. 303	23.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	23.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 50 hs.
C. 271	23.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 100 hs.
	23.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 108 hs.
C. 273	23.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	23.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 84 hs.
C. 274	23.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	23.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 108 hs.
C. 308	23.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	23.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 50 hs.
C. 329	23.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	23.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 36 hs.

Esta sangria foi praticada 10 dias depois da inoculação de 70 U. floculantes de anatoxina tetanica. Em dois preás, nos. 15 e 20, o sôro possue quantidade suficiente de antitoxina para proteger camondongos contra a inoculação de 1 e 2 D.D.M.M.L.L. de toxina tetanica. Nenhuma cobaia inoculada poude, dentro deste curto periodo, produzir antitoxina suficiente para proteger os camondongos contra as mesmas D.M.L..

QUADRO XVI

Resultado dos doseamentos 30 dias após a injeção de 70 unidades floculantes de Anatoxina Tetanica

No. do animal	Data da prova	Toxina		Camondongo	
		em Mg.	em D.M.L.	Peso	Resultado
P. 15	12.VIII.37	0,01	2 D.M.L.	30	S.
	12.VIII.37	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	1,50	300 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	3,00	600 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	4,50	900 D.M.L.	30	S.
P. 20	12.VIII.37	0,025	5 D.M.L.	30	S.
	12.VIII.37	0,05	10 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	1,50	300 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	2,50	500 D.M.L.	30	S.
P. 28	12.VIII.37	0,01	2 D.M.L.	30	S.
	12.VIII.37	0,025	5 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	S.
P. 37	12.VIII.37	0,01	2 D.M.L.	30	S.
	12.VIII.37	0,025	5 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,05	10 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	4,00	800 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	5,00	1.000 D.M.L.	30	S.
P. 303	12.VIII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 132 hs.
	12.VIII.37	0,025	5 D.M.L.	30	M. 108 hs.
	15. II.38	0,40	80 D.M.L.	30	M. 48 hs.
	15. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	M. 24 hs.
C. 271	12.VIII.37	0,01	2 D.M.L.	30	S.
	12.VIII.37	0,025	5 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	4,00	800 D.M.L.	30	M. 36 hs.
C. 273	12.VIII.37	0,01	2 D.M.L.	30	S.
	12.VIII.37	0,025	5 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,10	20 D.M.L.	30	S.
C. 274	12.VIII.37	0,01	2 D.M.L.	30	S.
	12.VIII.37	0,025	5 D.M.L.	30	S.
C. 329	12.VIII.37	0,01	2 D.M.L.	30	S.
	12.VIII.37	0,025	5 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,05	10 D.M.L.	30	S.

Sangria praticada 30 dias após a inoculação da anatoxina tetanica.

O preá n.º 37 atingiu neste curto intervalo o maximo de sua curva antitoxica, sendo 0,1 cc. de seu sôro capaz de conferir proteção ao camondongo contra 1.200 D.M.L. O sôro de dois preás, nos. 15 e 20, poude proteger o camondongo contra mais de 900 e 500 D.M.L. respectivamente.

QUADRO XVII

Resultado dos doseamentos 50 dias após a injeção de 70 unidades floculantes de Anatoxina Tetanica

No. do animal	*Data da prova*	*Toxina*		*Camondongo*	
		em Mg.	*em D.M.L.*	*Peso*	*Resultado*
P. 15	31.VIII.37	0,50	100 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	1,50	300 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	2,50	500 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	5,00	1000 D.M.L.	30	S.
P. 20	31.VIII.37	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	0,50	100 D.M.L.	30	S.
	16. II.38	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	16. II.38	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	22. II.38	5,00	1000 D.M.L.	30	S.
P. 28	31.VIII.37	0,05	10 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	0 25	50 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,40	80 D.M.L.	30	S.
	22. II.38	2,00	400 D.M.L.		
P. 37	31.VIII.37	00,05	10 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	4,00	800 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	5,00	1000 D.M.L.	30	M. 48 hs.
P. 303	31.VIII.37	0 05	10 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	0,10	20 D.M.L.	30	S.
C. 271	31.VIII.37	0,05	10 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	22. II.38	2,00	400 D.M.L	30	S.
	22. II.38	4,00	800 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	7,50	1500 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	10,00	2000 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	15,00	3000 D.M.L.	30	S.

QUADRO XVII (Continuação)

Resultado dos doseamentos 50 dia após a injeção de 70 unidades floculantes de Anatoxina Tetanica

No. do animal	Data da prova	Toxina		Camondongo	
		em Mg.	em D.M.L.	Peso	Resultado
C. 273	31.VIII.37	0,05	10 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	0,25	80 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,40	50 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	1,50	300 D.M.L.	30	S.
	22. II.38	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	22. II.38	2,50	500 D.M.L.	30	S.
	16. II.38	3,50	700 D.M.L.	30	S.
	16. II.38	4,00	800 D.M.L.	30	M. 12 hs.
C. 274	31.VIII.37	0,05	10 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,40	80 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	1,50	300 D.M.L.	30	S.
C. 329	31.VIII.37	0,05	10 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,40	80 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	1,50	300 D.M.L.	30	M. 24 hs.

4a sangria — Sangria feita 50 dias depois da inoculação da 2a dose de antigeno. Todas as cobaias inoculadas atingiram uniformemente o maximo de sua curva antitoxica nesta data. O sôro de uma das cobaias protegeu na dose de 0,1 cc., o camondongo contra 3.000 D.M.L., quando inicialmente não protegia nem contra 1 D.M.L. Isto evidencia a sensibilidade das cobaias a um estimulo antigenico maior e a capacidade imunizante da anatoxina utilizada. Dois preás, nos. 20 e 15, atingiram tambem o maximo de sua curva antigenica, conferindo 0,1 cc. de seu sôro, proteção ao camondongo contra a inoculação de 1.000 D.M.L. Camondongos inoculados com doses maiores apresentaram sintomas de tétano. O preá N.º 37 apresentou nesta data queda acentuada do titulo antitoxico de sôro.

QUADRO XVIII

Resultado dos doseamentos 80 dias após a injeção de 70 unidades floculantes de Anatoxina Tetanica

No. do animal	*Data da prova*	*Toxina*		*Camondongo*	
		em Mg.	*em D.M.L.*	*Peso*	*Resultado*
P. 28	3.XI.37	0,40	80 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,50	100 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,40	80 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,50	100 D.M.L.	30	S.
P. 37	25.XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,40	80 D.M.L.	30	S.
P. 303	25.XI.37	0,50	100 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,40	80 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,50	100 D.M.L	30	S.
C. 271	25.XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,40	80 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,50	100 D.M.L.	30	S.
C. 274	25.XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,40	80 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,50	100 D.M.L.	30	S.
C. 329	25.XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	S.

Sangria praticada 80 dias após a inoculação do antigeno. Verifica-se a queda lenta do titulo antitoxico das cobaias, mais lenta do que nas experiencias anteriores. Ao lado desta queda, verifica-se um crescimento progressivamente lento do teor antitoxico do sôro de 2 preás.

Nota: — Não foi praticada a sangria na cobaia 273. Os preás 15 e 20 morreram por terem recebido alimentação impropria.

QUADRO XIX

Resultado dos doseamentos 100 dias após a injeção de 70 unidades floculantes de Anatoxina Tetanica

No. do animal	*Data da prova*	*Toxina*		*Camondongo*	
		em Mg.	*em D.M.L.*	*Peso*	*Resultado*
P. 28	27. XI 37	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	27. XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	27. XI.37	1,50	300 D.M.L.	30	M. 24 hs.
P. 303	27. XI.37	1,50	300 D.M.L.	30	S.
	27. XI.37	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	27. XI.37	2,50	500 D.M.L.	30	S.
C. 271	27. XI.37	1,50	300 D.M.L.	30	S.
	27. XI.37	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	27. XI.37	2,50	500 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	3,00	600 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	3,50	700 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	4,00	800 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	5,00	1.000 D.M.L.	30	S.
C. 273	27. XI.37	0,50	100 D.M.L.	30	S.
	27. XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	27. XI.37	1,50	300 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	2,50	500 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	3,00	600 D.M.L.	30	M. 36 hs.
C. 274	27. XI.37	1,50	300 D.M.L.	30	S.
	27. XI.37	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	27. XI.37	2,50	500 D.M.L.	30	S.
C. 329	27. XI.37	1,50	300 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	27. XI.37	2,00	400 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	27. XI.37	2,50	500 D.M.L.	30	M. 12 hs.
	3.XII.37	1,25	250 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	3.XII.37	1,00	200 D.M.L.	30	M. 48 hs.
	15. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	M. 36 hs.

Sangria praticada 100 dias após a inoculação do antigeno.

Como na dosagem anterior continúa progredindo lentamente a queda do titulo antitoxico das cobaias, enquanto se dá a ascenção lenta do teor antitoxico do sôro de 2 preás.

Nota: — O preá No. 37 morreu por ter recebido alimentação inadequada.

QUADRO XX

Resultado dos doseamentos 130 dias após a injeção de 70 unidades floculantes de Anatoxina Tetanica

No. do animal	*Data da prova*	*Toxina*		*Camondongo*	
		em Mg.	*em D.M.L.*	*Peso*	*Resultado*
P. 28	3.XII.37	1,00	200 D.M..L	30	S.
	3.XII.37	1,50	300 D.M.L.	30	S.
	16. II.38	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	16. II.38	3,00	600 D.M.L.	30	S.
	16. II.38	3,50	700 D.M.L.	30	S.
	22. II.38	5,00	1000 D.M.L.	30	M. 48 hs.
P. 303	3.XII.37	2,50	500 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	3,00	600 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	3,25	650 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	3,50	700 D.M.L.	30	M. 24 hs.
C. 271	3.XII.37	2,50	500 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	3,00	600 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	4,00	800 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	6,00	1200 D.M.L.	30	S.
C. 273	3.XII.37	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	2,50	500 D.M.L.	30	S.
C. 329	15. II.38	0,25	50 D.M.L.	30	M. 48 hs.
	15. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	3.XII.37	1,00	200 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	3.XII.37	1,50	300 D.M.L.	30	M. 24 hs.

Sangria praticada 130 dias depois da inoculação do antigeno. O preá No. 28 atinge somente agora o maximo da curva antitoxica, protegendo 0,1 cc. de seu sôro o camondongo inoculado com 1.200 D.M.L. de toxina. O titulo antitoxico do sôro do preá No. 303 continúa a crescer.

QUADRO XXI

Resultado dos doseamentos 150 dias após a injeção de 70 unidades floculantes de Anatoxina Tetanica

No. do animal	*Data da prova*	*Toxina*		*Camondongo*	
		em Mg.	*em D.M.L.*	*Peso*	*Resultado*
P. 28	4. I.38	2,50	500 D.M.L.	30	S.
	4. I.38	3,00	600 D.M.L.	30	S.
	4. I.38	3,50	700 D.M.L.	30	S.
	22.II.38	4,00	800 D.M.L.	30	M. 36 hs.
P. 303	4. I.38	2,50	500 D.M.L.	30	S.
	4. I.38	3,00	600 D.M.L.	30	M. 84 hs.
C. 271	4. I.38	2,50	500 D.M.L.	30	S.
	4. I.38	3,00	600 D.M.L.	30	S.
	4. I.38	4,00	800 D.M.L.	30	S.
	16.II.38	5,00	1000 D.M.L.	30	M. 12 hs.
C. 273	4. I.38	2,50	500 D.M.L.	30	S.
	4. I.38	3,00	600 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	4. I.38	4,00	800 D.M.L.	30	M. 36 hs.
C. 329	4. I.38	0,10	20 D.M.L.	30	S.
	4. I.38	0,25	50 D.M.L.	30	M. 48 hs.
	3. I.38	0,50	100 D.M.L.	30	M. 20 hs.

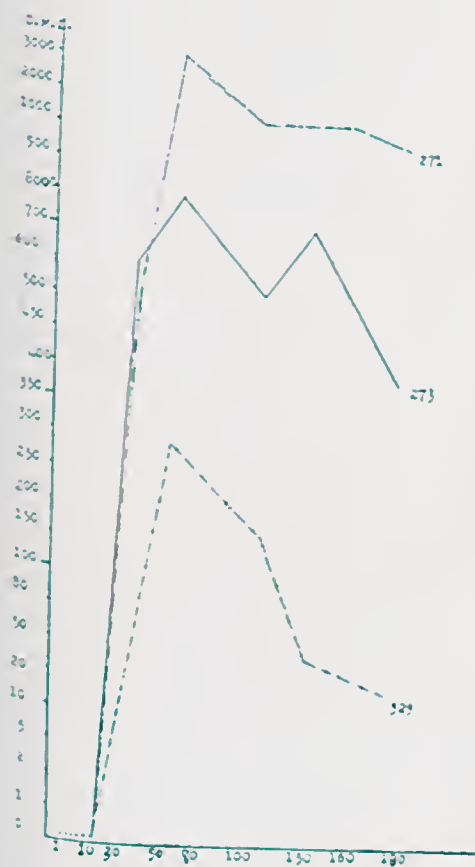
Sangria feita 150 dias depois da inoculação do antigeno. O preá No. 303 atinge o maximo do teor antitoxico, protegendo 0,1 cc. de seu sôro o camondongo contra 750 D.M.L. de toxina. A quéda da curva antitoxica das cobaias continúa lentamente.

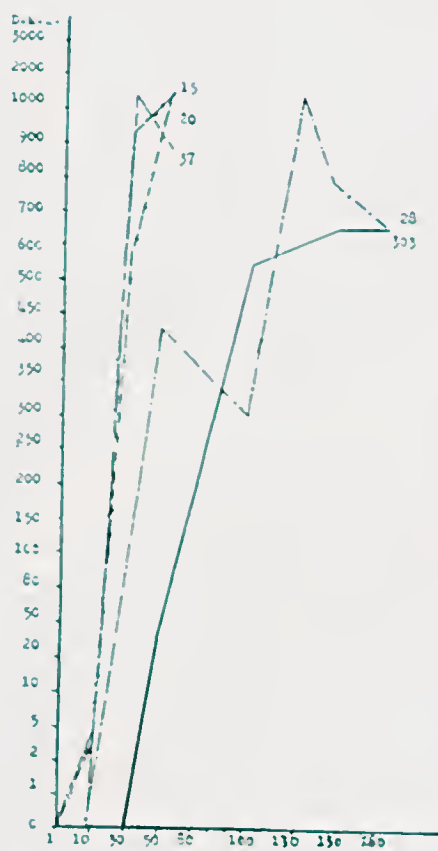
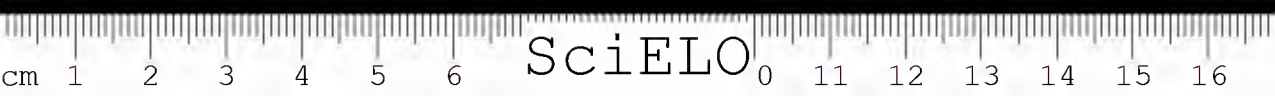
QUADRO XXII

Resultado dos doseamentos 180 dias após a injeção de 70 unidades floculantes de Anatoxina Tetanica

No. do animal	Data da prova	Toxina		Camondongo	
		em Mg.	em D.M.L.	Peso	Resultado
P. 28	16.II.38	1.75	700 D.M.L.	30	M. 24 hs.
P. 303	16.II.38	2.00	400 D.M.L.	30	S.
	16.II 38	2.50	500 D.M.L.	30	S.
	16.II.38	3.00	700 D.M.L.	30	S.
C. 271	16.II.38	3.50	700 D.M.L.	30	S.
	16.II.38	4.00	800 D.M.L.	30	S.
	16.II.38	5.00	1.000 D.M.L.	30	S.
C 273	16.II.38	2.00	400 D.M.L.	30	M. 24 hs.
	16.II.38	2.50	500 D.M.L.	30	M. 24 hs.
	16.II.38	3.00	600 D.M.L.	30	M. 24 hs.
C. 329	16.II.38	0.05	10 D.M.L.	30	S.
	16.II.38	0.25	50 D.M.L.	30	M. 42 hs.

Sangria praticada 180 dias depois da inoculação de 70 unidades floculadas de anatoxina. O titulo antitoxico dos preás vai lentamente em declinio.

Graf. III

Curva de imunização das cobaias que receberam 70 unidades floculantes de anatoxina tetanica.

Graf. IV

Curva de imunização dos preás que receberam 70 unidades floculantes de anatoxina tetanica.

Relação entre antitoxina circulante e a imunidade do animal

Com o fim de verificar si havia relação entre a antitoxina circulante obtida pela imunização ativa por meio da inoculação de 70 unidades floculantes de anatoxina tetanica, inoculamos 100 D.M.L. de toxina tetanica (D.M.L. para cobaias de 350 gs. 1/30.000) no segundo lote de preás e cobaias imunizados; 4 cobaias e 3 preás não imunizados serviam de testemunha, sendo inoculadas com 1 D.M.L.

QUADRO XXIII

Lote 3

Dose total de anatoxina em unidades floculantes	Data da prova	Nome do animal	Dose de toxina em D.M.L.	Resultado	Observação
70	4.II.38	Preá 28	100	S.	Imuniz.
70	4.II.38	" 303	100	S.	"
70	4.II.38	Cob. 271	100	S.	"
70	4.II.38	" 273	100	S.	"
70	4.II.38	" 329	100	S.	"
Testemunha	4.II.38	Cob. 469	1	M. 84 hs.	Normal
"	4.II.38	" 470	1	M. 84 hs.	"
"	4.II.38	" 471	1	M. 84 hs.	"
"	4.II.38	" 468	1	M. 96 hs.	"
"	4.II.38	Preá 43	1	S.	"
"	4.II.38	" 267	1	S.	"
"	4.II.38	" 287	1	M. 132 hs.	"

Verifica-se deste quadro que os animais imunizados ativamente (cobaias ou preás) apresentavam notavel resistencia contra a toxina tetanica, e que podiam resistir a mais 100 D.M.L., ao passo que as cobaias testemunhas não resistiam nem a 1 D.M.L. de toxina tetanica. Ha, pois, como era de esperar, paralelismo entre a quantidade de antitoxina circulante e a resistencia animal.

Diferença de comportamento das preás e cobaias em relação á toxina tetanica

Quanto aos preás, o quadro XXIII demonstra que são muito mais resistentes ou por outra, menos suscetiveis á toxina tetanica; ao passo que as cobaias tiveram 100 % de morte, os preás tiveram só 33 % com 67 % de proteção. O preá que não resistiu, morreu só 132 hs. depois da inoculação da toxina, isto é, muito mais tarde do que as cobaias, que morreram em media 87hs. depois da inoculação. Os preás apresentam pois, um carater maior de resistencia á toxina tetanica do que as cobaias.

Diferença de comportamento das preás e cobaias em relação ao teor da antitoxina tetanica

Na pratica, notaveis prejuizos podem decorrer desta maior resistencia dos preás ou de seus descendentes quando se usam preás ou seus descendentes no doseamento da antitoxina tetanica. Desde que eles são mais resistentes, os pequenos traços de toxina residual, não neutralizados, serão insuficientes para matá-los como deveria ocorrer em virtude de sua maior resistencia. Disso decorre a possibilidade de apresentarem as aferições, feitas em preás, resultados acima dos reais. Estas dificuldades mais se acentuam quando se empregam hibridos na fixação do L + (limite de morte) de uma dada toxina conforme se verifica dos quadros abaixo.

QUADRO XXIV

Determinação do limite de morte (L +)

Toxina	Soro	Diluição do soro	Cobaia	Peso	RESULTADO				
					22|3	23|3	24|3	25|3	Obs.
0.00058	S|Padrão	1|50	126	290	S. S.	S. S.	S. 1.	S. 1.	S.
0.00060	S|Padrão	1|50	129	300	S. S.	S. S.	S. 1.	S. gr	S.
0.00062	S|Padrão	1|50	130	300	S. S.	S. S.	S. S.	S. 1.	S.
0.00064	S|Padrão	1|50	133	300	S. S.	S. S.	S. 1.	S. 1.	M [illegible]
0.00066	S|Padrão	1|50	121	329	S. S.	S. 1.	S. gr	S. gr	M 26|3|[illegible]
0.00068	S|Padrão	1|50	120	320	S. S.	S. S.	M. 21|3		
0.00070	S|Padrão	1|50	131	320	S. S.	S. S.	S. gr	S. gr	M 25|26|[illegible]
0.00075	S|Padrão	1|50	116	320	S. S.	S. S.	S. gr	M. às	S hs [illegible]
0.00080	S|Padrão	1|50	125	330	S. S.	S. S.	S. gr	S. gr	S.

S. S. = sem sintomas.
S. 1. = sintomas leves.
S. gr. = sintomas graves.
M = morte.
S = sobrevida.

Nota: — A cobaia n.º 125 tinha as cores dum preá legitimo, mas suas suturas naso-frontais eram de tipo intermediario entre o de cobaia e o de preá, testemunhando o caráter mestiço do animal; doseamento prejudicado.

Um lote paralelo de cobaias exteriormente puras nos deu o seguinte resultado:

QUADRO XXV

Determinação do limite de morte

Toxina	Soro	Diluição do soro	Cobaia	Peso	RESULTADO				
					22|3	23|3	24|3	25|3	Obs.
0,00058	S|Padrão	1|50	117	290	S. S.	S. S.	S. S.	S. L.	S.
0,00060	S|Padrão	1|50	128	300	S. S.	S. S.	S. S.	S. gr	S.
0,00062	S|Padrão	1|50	119	300	S. S.	S. S.	S. L.	S. gr	M. 30|3
0,00064	S|Padrão	1|50	123	310	S. L.	S. M.	S. M.	S. gr	M. 28|3
0,00066	S|Padrão	1|50	115	310	S. L.	S. M.	S. M.		M. 16 hs. 25|3
0,00068	S|Padrão	1|50	122	320	S. S.	S. L.	S. gr		M. 16 hs. 25|3
0,00070	S|Padrão	1|50	127	320	S. L.	S. L.	S. gr		M. 24—25|3
0,00075	S|Padrão	1|50	132	320	S. L.	S. M.	S. gr		M. 24—25|3
0,00080	S|Padrão	1|50	134	330	S. L.	S. M.	S. gr		M. 24—25|3

Quando se usam hibridos e doses muito diferentes de toxina na determinação do L +, corre-se o risco de tomar como L + uma dose excessivamente alta de toxina nas aferições posteriores dos sôros, principalmente quando nestas se empregam só cobaias (e não hibridos). Si inicialmente nas determinações do L + se usam cobaias puras é de temer que nas verificações posteriores dos sôros se utilisem doses muito fracas de toxina desde que eventualmente se empreguem hibridos.

DISCUSSÃO

O metodo de doseamento empregado nas experiencias em curso nos forneceu sempre resultados comparativos. Este processo foi usado por TEN BROECK e BAUER (28-31) COLEMAN e MEYER (5) ZIA, KHA e LECH (38) MIKHAILOVA e WELIKANOV (21); estes ultimos muito recentemente empregaram esta tecnica na avaliação da atividade antitoxica do sôro de individuos imunizados ativamente por meio da anatoxina tetanica. Com as tecnicas de ADAMSON (1) e GILLES (102) e de SPRY (27) realisamos investigações que estão em curso, afim de verificar si os preás são portadores e eliminadores de Cl. tetani.

Em uma primeira serie de experiencias procurámos verificar si um estimulo fraco de 28 unidades floculantes em 2 doses era suficiente para que os preás se imunizassem. Pudemos verificar que nas cobaias a curva antitoxica do sôro atingiu o maximo entre 100 e 130 dias, protegendo 0,1 cc. de seu sôro o camondongo contra um maximo de 800 D.M.L. de toxina tetanica. Nos preás, o acme foi atingido 130 dias depois a 2ª inoculação, conferindo seu sôro proteção contra um maximo de 600 D.M.L.. Nesta primeira serie as cobaias se imunizam um pouco mais rapidamente do que os preás; estes no entanto, apresentam uma ca-

pacidade de imunização mais uniforme. A não imunização de um dos preás, o n.º 232, sugere que estes estudos necessitam ser retomados com um numero maior de animais de experiencia.

Si, de um lado, os preás se imunizam mais demoradamente e menos intensamente, conservam, por outro lado, um titulo antitoxico mais elevado e por mais tempo.

Em uma segunda serie de experiencias os animais inoculados com 70 unidades floculantes de anatoxina tetanica mostram resultados diversos dos obtidos na primeira serie. Nas cobaias o sôro atingiu o ponto maximo de sua curva antitoxica 50 dias após a inoculação do antigeno. Um decimo de cc. do sôro de uma das cobaias foi suficiente para proteger o camondongo contra 3.000 D.M.L. Um dos preás alcançou aquele maximo 30 dias após a injeção do antigeno, conferindo seu sôro proteção contra 1.2000 D.M.L. de toxina. Em dois outros preás alcançou o sôro titulo antitoxico maximo com intervalo de 130 e 150 dias, protegendo 0,1 cc. dele contra 1.200 e 650 D.M.L. respectivamente. Tanto no primeiro como no segundo lote, a curva antitoxica começou a declinar depois de ter atingido o maximo; a queda já era bastante acentuada 200 dias depois da injeção do antigeno, sendo mais visivel nos animais que receberam estimulo antigenico menor.

Existe portanto uma relação direta entre a dose de anatoxina inoculada e a quantidade de anticorpos circulantes, conforme ja haviam notado tambem *Lerst* e SCHMIDT (19).

Os animais imunizados ativamente apresentam notavel resistencia contra mais de 100 D.M.L. de toxina, ao passo que os não imunizados morrem quando inoculados com 1 D.M.L. da mesma toxina.

Quanto ao seu comportamento diante da toxina tetanica, verifica-se que 33 % dos preás apresentam carater de resistencia á toxina tetanica, ao passo que 100 % das cobaias apresentam carater de suscetibilidade. As diferenças obtidas entre cobaias e preás são tão nitidas, que no serviço sorologico seria prejudicial usar preás ao lado de cobaias. Na primeira geração do cruzamento entre cobaias e preás existe uma imunidade intermediaria. Todavia, estes naimais da primeira geração podem facilmente ser eliminados, pois mostram o aspecto de preás, quer dizer, cotia. Mais perigosos, porém, são os animais das gerações seguintes, nas quais as diferentes qualidades obtidas de cobaias e de preás se desligam, dando por exemplo um animal cor cobaia e de imunidade preá, ou de cor cotia e de imunidade cobaia.

Examinamos um carater morfologico diferente em cobaias e preás: as suturas naso-frontais e fronto-parietais, seguindo as indicações de Detlefsen (24). Como se vê nos Quadros II-IV, certo numero das cobaias mostra suturas intermediarias, o que significa que estes, sem duvida, são descendentes do cruzamento cobaia-preá. São os animais seguintes:

n.º 262 do Bioterio geral de Butantan: cor branca, pelagem crespa.
n.º 295 " " " " " " " " "
n.º 471 " " " " " " branca-amarela preta, pelagem lisa.
n.º 271 da Faculdade de Medicina, de Butantan: cor branca-amarela, pelagem lisa.

Este ultimo animal tinha sutura naso-frontal indistinguivel do preá, emquanto a sutura fronto-parietal era como a duma cobaia. (vide fig. IV).

Alem destas cobaias, que eram seguramente descendentes do cruzamento entre as duas especies, tinhamos mais um animal, o de No. 468 (Quadro XXIII), que mostrando as cores branca-amarela-*cotia*, traindo a sua origem mestiça, evidenciou tambem um caracter de sucetibilidade menor, com certeza herdado de preás.

Numa mesma geração, além dos caractéres morfologicos, encontra-se grande diferença na faculdade de imunização; comparemos só os três irmãos Nos. 311, 312 e 313 na curva (Graf. 1): o n.º 313 imunizou-se facilmente, enquanto os dois ... revelaram peores do que todas as outras cobaias. Diante dos resultados obtidos, esses três irmãos revelavam claramente na sua ascendencia ter havido um cruzamento de especies *porcellus* e *rufescens*.

Si é verdade, que os mestiços masculinos parecem ser todos estereis segundo já verificára Detlefsen e nós pudemos confirmar, as femeas são duma fertilidade extraordinaria.

As três primeiras femeas mestiças da nossa criação (Preá ♀ × Cobaia ♂) deram as seguintes ninhadas:

No. 2 M nascida 15/11/36				No. 280 nascida 15/2/37				No. 281 nascida 15/2/37		
25/ 4/37	1	filhote		23/ 8/37	1	filhote		25/ 9/37	2	filhotes
19/ 7/37	1	"		27/10/37	2	"	(s)	30/11/37	2	"
21/ 9/37	4	"	(s)	30/12/37	1	"		3/ 2/38	4	"
26/11/37	2	"								
1/ 2/38	3	"								

Disso decorre a necessidade de se substituirem as cobaias do Bioterio de Butantan por uma raça pura e uniforme no seu poder imunizante e reativo. Parece tambem certo que fóra de Butantan ha em São Paulo mestiços conforme se vê pela cobaia acima mencionada No. 271 (Fig. IV) que veio do Bioterio da Faculdade de Medicina e mostrava indicio certo de sangue preá.

A criação de raças puras com pequena amplitude de variação nos teores sorologicos é muito mais facil, mais rapida e mais eficaz, do que o metodo quasi sempre aplicado pelos imunologos baseado na seleção entre individuos duma população.

CONCLUSÕES

1.º — A generalidade dos preás não possue antitoxina de origem natural no sôro. Nenhuma das cobaias examinadas demonstrou possuir no sôro antitoxina de origem natural.

2.º — As cobaias são mais suscetiveis á toxina tetanica do que os preás, que são claramente mais resistentes.

3.º — Ao contrario do que ocorre com a anatoxina difterica, a anatoxina tetanica parece imunizar a maioria dos preás tão bem como as cobaias, embora a curva de imunização seja diferente.

4.º — O grau de imunidade depende da quantidade de antigeno inoculado em cada animal, dentro de certo limite.

5.º — Quando se usam individuos hibridos de cobaia e preás, as diferenças de suscetibilidade dos preás e cobaias á toxina tetanica, tornam-se bem patentes e acarretam mesmo notaveis prejuizos na avaliação da D.M.L. das toxinas tetanicas, dado o grande numero de animais que exigem para cada prova. Esses prejuizos ainda surgem quando com tais hibridos se faz o doseamento das antitoxinas, isto como resultado da ação de quantidades residuais de toxina, libertados pela neutralização parcial da antitoxina homologa.

6.º — E necessario selecionar raças de cobaias puras com fraca amplitude na variação de idade com que atingem o peso padrão de 350 gs..

BIBLIOGRAFIA

1. *Adamson, R. S.* — On the cultivation and isolation of Bacillus tetani — Journ. Pathol and Bact. XXIII, 241,1919-20.
2. *Bradford, Hill A.* — The inheritance of resistance to bacterial infection in animal species. Special Report Series n.º 196. His Majestr's St. Off. 1934.
3. British System of Bacteriology 6:108.1931.
4. *Cole, L. J.* — Inheritance of disease resistance in animals. Amer. Nat. 65: 5. 1931.
5. *Coleman, G. E. e Meyer, K. F.* — Characteristics of new strain of Cl. tetani. Journ. Inf. Dis. 39:328.1926.
6. *Coleman, G. E.* — Intestinal carriers of *Cl. tetani* and immunity. Tetanus IX. Am Journ. Hyg. 14 (3) 515, 1931.
7. *Detlefsen, J. A.* — Genetic studies on a Cavy Species Cross. Washington. 1934. I.1.12. Plate I. X. 1.81.
8. *Dreyfus-See, G. e Lesné, E.* — Selection d'espécies a caracteres immunitaires fixes. Transmission de ces caracteres selon les lois mendelienes et modifications durables obtenus par les vacc'nations répétées. C. R. Soc. Biol. 98: 922. 1928.
9. *Ehrlich, P.* — Über Immunitat durch Vererbung und Säugung. Z. Hyg. Infekt. 12: 183. 1892.

10a) *Gilles, E. C.* — A satisfactory method of isolating tetanus organims from mixed material .The Am. Journ. of Hyg. 26 (2) :394. 1937.

10b) *Gilles, E. C.* — A study of the biochemical reactions of strains of Cl. tetani isolated from street dust. The Am. Journ. of Hygiene 26 (2) 401, 1937.

11. *Glenny, A. T.* e *Südmersen, H. J.* — Journ. Hygiene 9: 3933. 1909.

12. *Grasset, E.* — A comparative study of the aplitude of the higher animal organism to acquire immunity throughout the vital cycles and the relation of this aptitude to hereditary transmission. The South African Inst. for Med. Res. IV (XXIV: 17.1929.

13. *Herwich, R. P.; Weir, E. F.* e *Tat: n, A. L.* — "Seasonal variotion in Susceptibiliyt of animals to tetanus toxin". Proc. Soc. Exper. Med. XXXV: 256. 1936.

14. *Irwin, M. R.* — Inheritance as a factor in resistance to an infection disease. I. The uniform reaction of inbred strain of animals. Journ. Imm. 24: 285. 1933.

15. *Irwin, M. R.* — II. Differential Host Reactions and the effects of selection within a population. Journ. Imm. 24: 297. 1933.

16. *Irwin, M. R.* — Inheritance as a factor in resistance to an infections disease. IV. The correlations between resistance of the host and certain mea sured varables. Journ. Imm. 24: 330. 1933.

17. *Lambert, W. V.* — Natural resistance to disease in chicken. I. The effect of selective breeding on natural resistance to fowl typhoid. Journ. Imm. 23: 229. 1932.

18. *Lambert, V* — The evidence for inheritance of resistance to Bacterial disease in animals. Quarterly Rev. Biol. VIII: 33. 1933.

19. *Larsen, A. S.* — *Schmidt, S.* — Immunisation active contre le tetanos au moyen de l'anatoxine de G. Ramon — Acta Pathol. et Microb. Scand XIII (1): 61, 1935.

20. *Lemétayer, E.* — Relation entre la pigmentation de peau et la résistance a l'intoxication tetanique chez le cobaye. C. R. Soc. Biol. 112: 354. 1933.

21. *Mikhailova, Z* e *Welikanov, I* — L'Immunisation active de l'homme contre le tetanos. Rev. D'Imm. 2 (3): 63. 1936.

22. *Nicole e Ramon* — Citados por Lemetayer C. R. S. B. 112; 354. 1933.

23. *Perrin, M.* e *Alain Cuénot* — Sur la resistance a la toxine tetanique du cobaye albino. C. R. Seance Soc. Biol. 106. 199. 1931.

24. *Rosenau, M. J.* e *Anderson, J. F.* — The Standartization of Tetanus antitoxin. Hygenic Lab. Bulletin, 43: 6,march. 1908.

25. *Schott, R. G.* — "The inheritance of resistance to Salmonella aertryke in various strains of mice". Genetic 17: 203. 1932.

26. *Smith, T.* — Degrees of susceptibility to diphteria toxin among guineapigs. Transmission from parents to offspring. J. Med. Res. 13: 341. 1905.

27. *Spray, R. S.* — Semisolid media for cultivation and identification of the sporulating anaerobes. Journ. of Bact. 32 (2): 135. 1936.

28. *Ten Broeck, C. Bauer, J.* — The tetanus bacillus as an intestinal saprophyte in man. The Journ. Exp. Med. XXXIV, 261. 1922.

29. *Ten Broeck, C. Bauer, J.* — Studies on the relation of tetanus bacilli in the degestive tract to tetanus antitoxin in the blood. The Journ. Exp. Med. XXXVII, 479, 1923.

30. *Ten Broeck, C. Bauer, J.* — The immunity produced by the Growth of tetanus bacilli in the digestive tract. The Journ. of Med. XLIV, 361. 1926.

31. *Ten Broeck, C. Bauer, J.* — Tetanus carriers in experimental animals. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 21, 267, 1923-24.

32. *Topley, W. W. C.; Wilson, J. e Lewis, E. R.* — Jour. Hyg. 23: 425. 1925.

33. *Ubisch, G. von e Amaral, J. Planet do* — Differença da capacidade de immunização da cobaia (Cavia porcellus L.) e do preá (Cavia rufescens Lund) contra a anatoxina diphterica. Men. Inst. Butantan X: 179. 1935-1936.

34. *Ubisch, G. von e Amaral, J. Planet do* — Unterschied der zahmen und wilden Meerschweinchen (Cavia porcellus Lund Cavia rufescens Lund) bezüglich ihrer Immunisierbarkeit durch Diphtherieanatoxin. Genetica XX½ 51-58 Haag. 1938.

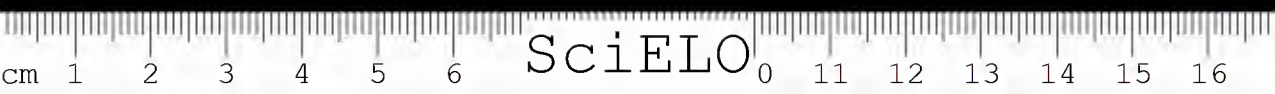
35. *Webster, L. T.* — Microbic virulence and host suceptibility in paratyphoidenteritidis infection of white mice. IV. The effect of selective breeding on host resistance Journ. Exper. Med. 39: 879. 1924.

36. *Wilson, G. S.* — Transient fluctuations in the resistance of mice to infection with P aertrike. Journ. Hygiene 30: 196. 1930.

37. *Wright, S. e Lewis, P. A.* — Factor in the resistance of the guinea-pig to tuberculosis whit special regard to inbreeding and heredity. Amer. Nat. 55: 20. 1921.

38. *Zia, S. H.; Kha-Tim Lim, Leach, C. N.* — La teneur en antitoxine du sang de la mère et du nouveau né après injection d'anatoxine tetanique de Ramon aux mères enceintes. Rev. D'Immunol. 2 (3): 260 1936.

(Por gentileza do Prof. G. Ramon, do Instituto Pasteur de Paris foi o presente trabalho publicado em francês na "Revue d'Immunologia" 5(1):54.1939. Publicado posteriormente no "Brasil-Medico" 53(1. 23.1939).

599.32:616.854

COMPORTEMENT DU COBAYE *(CAVIA PORCELLUS L.)* ET DU PRÉA *(CAVIA RUFESCENS* LUND*)* VIS-A-VIS DES ANTIGENES TÉTANIQUES (*)

PAR

ARIOSTO BÜLLER SOUTO ET GERTRUD VON UBISCH

Pour le contrôle du pouvoir antigénique de l'anatoxine tétanique et le dosage du sérum antitétanique en unités américaines selon le procédé en usage à l'Instituto Butantan, on utilisé le cobaye, animal très sensible.

Suivant Rosenau et Anderson (24), le pouvoir protecteur d'une antitoxine tétanique est évalué d'après la plus faible quantité de cette antitoxine nécessaire pour protéger la vie d'un cobaye de 350 grammes pendant quatre-vingt seize heures contre la dose d'épreuve de la toxine étalon.

Pour apprécier exactement les résultats des dosages, il faut que les variations individuelles dans les réactions immunologiques, chez les lots de cobayes employés, ne soient que légères. Les lots de cobayes doivent donc être étalonnés autant que possible. A cet égard, écrivent Dreyfus et Lesné (8): "Chez les animaux plus petits qui servent aux expériences de laboratoire, la détermination exacte des propriétés d'immunité ou de sensibilité vis-à-vis de certains affections a un intérêt indiscutable. Il faut, en effet, se méfier habituellement des variations individuelles et on conçoit sans peine qu'il est important lors des dosages de toxicité par exemple que leurs réactions soeint comparables les unes aux autres. Irwin (14) établit aussi que:" In all experiments dealing with the intereaction of pathogenic bacteria and their host, almost the most desirable characteristic in the studies, and the most difficult to obtain, is the uniformity reacting strain in the animals". Wilson (36) insiste de la façon suivante: sur les multiples difficultés que l'on éprouve a obtenir des réactions uniformes: "The standardization of the dosage within reasonable limits presents little difficult, but the selection of animals of uniform resistance presents a problem that at the moment appears frankly insoluble".

(*) Revue d'Immunologie 5(1):54, 1939.

Toutefois, cette solution parai être donnée, du moins théoriquement, dans les postulats de Perrin et Cuénot (23): "Si une expérience veut être absolument précise, le protocole devra, non seulement spécifier le produit inoculé, mais aussi indiquer la nature du "terrain" qui le reçoit. La création d'une ou plusiers races homozygotes de cobayes, c'est-à-dire de formules génétiques constantes, est une nécessité; tant qu'elle ne sera pas réalisée, il sera impossibgle de répéter plusiers fois une même expérience de façon identique. La seule ressource que nous possédons actuellement est de multiplier les expériences pour obtenir des moyennes sérieuses". Ces auteurs soulignent la grande résistance des cobayes albinos, à la toxine tétanique, indiquant qu'une dose qui tue les cobayes pigmentés en moins de quatre-vingt cinq heures est parfaitement tolérée par les albinos. Par contre, Nicolle et Ramon (22) avaient déjà constaté que les albinos sont moins résistants aux toxi-infections. De telles vérifications furent confirmées par Lemetayer (20), qui arriva aux mêmes résultats, inoculant 1 D.M.M. de toxine tétanique, dans les muscles de la cuisse, à 131 cobayes et à un nombre égal de cobayes pigmentés. La discordance entre les résultats de Lemétayer, Nicolle et Ramon d'une part, et ceux de Perrin et Cuénot d'autre part, tient peut-être au fait qu'on peut isoler des races albinotiques de races pigmentées, dont la sensibilité est variable. Nous savons, en effet, que la mutation "albinos" est la plus fréquente, car elle se présente chez presque toutes les espèces d'animaux.

Le poids-étalon de 350 grammes constitue une nouvelle source d'erreurs, étant donné que ce poids est atteint plus tôt par une race que par l'autre, ce qui est aussi remarqué par Irwin (16): "Weight in itself is determined largely by hereditary factors". Nous avons eu l'occasion de constater ce fait en travaillant à l'Instituto Butantan avec trois races différentes de cobayes, nommés: Butantan, Faculdade de Medicina et Alemanha. La race "Butantan" est une "population" dans le sens génétique, car elle provient d'un croisement commencé il y a environ treize ans. La race "Faculdade de Medicina" a pour origine tout d'abord six cobayes aimablement donnés par le Prof. Paulo Sawaya, l'élevage ayant augmenté pendant un an et demi. La race "Alemanha" est une "race pure" dans le sens génétique, obtenue grâce a l'amabilité du Prof. Kroening, de l'Institut de Zoologie de Goettingen. Le tableau I donne le nombre de jours qu'il faut à ces animaux pour atteindre le poids-étalon de 350 grammes:

TABLEAU I

Provenance	*Age minime*	*Age maxime*	*Amplitude de variation*
Butantan	18 jours	62 jours	44 jours
Faculdade	32 "	61 "	29 "
Alemanha	34 "	53 "	19 "

Il n'est pas possible d'eliminerune certaine amplitude de variation, car le nombre des petits d'une nichée influe sur le poids des animaux dans les premiers mois de la vie, amoins qu'on prenne seulement des animaux d'une même nichée.

Il faut admettre également que la faculté d'immunisation et les autres propriétés du sang des rongeurs dépendent de l'âge aussi bien que du poids.

Tandis que les variations dues à l'existence d'animaux génétiquement non uniformes ne peuvent être éliminées que par l'élevage de races pures, d'autres, comme par exemple le manque d'uniformité de l'entourage, peuvent être soit prises en considération. Herwick, Weir et Tatum (13) trouverent que le cobaye est plus sensible à la toxine tétanique pendant l'été que pendant l'hiver, ce qui est exactement contraire à ce qui avait été constaté par Glenny et Suedmersen 11) et d'autres auteurs (3) pour la toxine diphtérique, laquelle est plus toxique pour le cobaye au cours de l'hiver que pendant l'été. Nous rapportons ces observations uniquement pour que notre travail soit complet, le but de cette série d'expériences étant d'étudier les différences immunologiques de certaines especes de cobayes. Il existe à l'Instituto Butantan en grand nombre de cobayes hybridisés avec des préas, ce qui nous amena à faire des expériences pour constater si le comportement des préas purs (et dans le cas affirmatif celui des hybrides préas-cobayes) était semblable à celui des cobayes pur lors des dosages de toxine tétanique et lors des essais d'immunisation, c'est-à-dire s'ils avaient la même résistance ou la même sensibilité et le même caractère réactif vis-a-vis de l'antigène tétanique.

Cette question avait pour nous une importance toute spéciale, car il avait déjà été constaté à l'Instituto Butantan (33) que les cobayes ont une capacité de réaction variable vis-à-vis de l'antigène diphtérique.

ANIMAUX EMPLOYÉS

On prit pour les expériences des préas purs et des cobayes élevés à l'Instituto Butantan et à la Faculdade de Médicine de São Paulo (les animaux reçus d'Allemagne ne s'étaient pas encore assez multipliés). Dans cette première expérience, faite seulement pour notre orientation, nous n'employâmes pas d'hybrides, car il nous fallait encore vérifier s'il y avait quelque différence physiologique entre les deux espèces *Cavia porcellus* et *Cavia rufescens*. Dans le cas affirmatif, l'expérience serait répétée avec des hybrides dont les pourcentages respectifs de sang de preá et de cobaye seraient connus. Le mot "sang" est ici employé dans le sens figuré, habituel dans l'élevage d'animaux, comme dans l'exemple suivant :

Cobaye ♀ × Preá ♂ = ½ sang cobaye et ½ sang préa.

(Cobaye ♀ × Preá ♂) × Preá ♂ = (c'est-à-dire une femelle de la première génération d'un croisement entre cobayes et préa croisée avec un préa pur) = ¼ de sang cobaye et ¾ de sang préa

(Cobaye ♂ × Preá ♀) × Cobaye ♂ = (c'est-à-dire une femelle de la première génération d'un croisement entre les cobayes et des préas croisées avec un cobaye pur) = ¾ sang. cobaye et ¼ sang préa.

♂

Etant donné le croisement fait à l'Instituto Butantan depuis treize ans, les animaux les plus intéressants pour nos expériences étaient ceux n'ayant que peu de sang preá. Le fait, que nous trouvâmes souvent des animaux à réactions immunologiques différentes (voyez pages 27 et 28) de celles espérées nous permit de soupçonner dès l'abord que ces espèces présenteraient de remarquables différences au point de vue immunologique.

TABLEAU II

Animaux employés dans la première expérience — Commencée le 20-V-37

No. Provenance	*Couleur*	*Pelage*	*Crâne*	*Poids initial*	*Espèce*
7 Pindamonhangaba ..	cotia	lisse	typique	300 gms.	Préa
31 "	"	"	"	460 "	"
304 Fazenda Butantan	"		"	350 "	"
238 " "	"	"	"	370 "	"
232 Ribeirão Pires	"	"	"	350 "	"
311 Fac. de Médécine	noire-jaune	lisse	typique	290 gms.	Cobaye
312 " " "	"	"	"	265 "	"
313 " " "	"	"	"	280 "	"
262 Inst. Butantan	blanche	frisse	aberrant	680 "	"
295 " "	"	lisse	peu aberrant	440 "	"
251 Fac. de Médécine	jaune-noire	"	typique	710 "	"

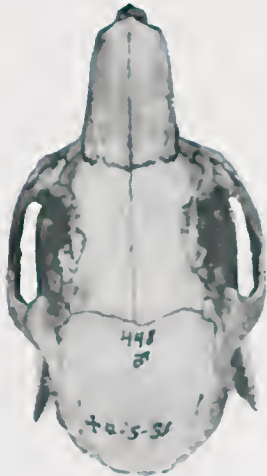
Fig. I

Cobaye typique.
Experience I.

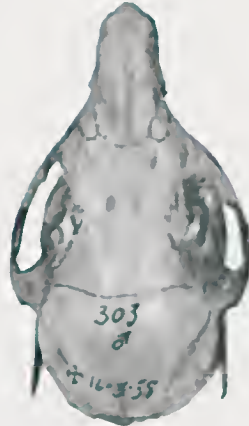
Fig. II

Preá typique.
Experience II.

Fig. III

Hybride, No. 125
Tableau XXIV.

Fig. IV

Hybride.
Experience II.

TABLEAU III

Animaux employés dans la deuxième expérience — Commencée le 4-VII-37

No. Provenance	*Couleur*	*Pelage*	*Crâne*	*Poids initial*	*Espèce*
15 Pindamonhangaba	cotia	lisse	typique	360 gms.	Preá
20 "	"	"	"	240 "	"
23 "	"	"	"	290 "	"
37 Né en captivité	"	"	"	185 "	"
303 Fazenda Butantan	"	"	"	285 "	"
271 Fac. de Médécine	blanche-jaune	lisse	typique	910 "	Cobaye
271 " " "	"	irisé	"	685 "	"
273 " " "	"	"	"	655 "	"
[illegible]8 " " "	"	lisse	naso-frontal preá	310 "	"
129 Inst. Butantan	"	"	front. pariet. cob.	365 "	"

Tous les animaux de l'expérience étaient mâles.

TABLEAU IV

Animaux employés dans la troisième expérience — Commencée le 4-II-38

No. Provenance	*Couleur*	*Pelage*	*Crâne*	*Poids initial*	*Espèce*
23 Animaux de la 2e. expérience	cotia	lisse	typique		Préa
303 " " "	"	"	"	295 gms.	"
271 " " "	blanche-jaune	"	métis	1145 "	Cobaye
273 " " "	"	irisé	typique	830 "	"
129 " " "	"	"	"	910 "	"
257 Vila Gomes	cotia	lisse	typique	365 gms	Préa
257 Agua Branca	"	"	"	440 "	"
. (?)	"	"	"	365 "	"
468 Inst. Butantan	blanche-jaune-cotia	"	"	340 "	Cobaye
469 " "	bl. jaune-noire	"	"	360 "	"
470 " "	jaune-noire	"	"	380 "	"
471 " "	bl. jaune-noire	"	aberrant	330 "	"

MÉTHODES

a) *Animaux d'expérience.* — 3 lots furent employés (v. tableaux II-IV): le 1.er lot de 5 péas et 6 cobayes reçut 28 unités floculantes d'anatoxine; le 2.e lot, composé de 5 préas et 5 cobayes, reçut 70 unités floculantes d'anatoxine; le 3.e lot, constitué par 3 péas et 4 cobayes, servit pour constater si les préas étaient plus résistants que les cobayes en l'absence d'immunisation antérieure; en outre, on prit 2 préas et 3 cobayes du 2.e lot pour le contrôle du pouvoir protecteur acquis au moyen de l'immunisation effectués.

b) *Antigène.* — On employa une anatoxine prépare à l'Instituto Butantan, titrant 7 unités floculantes par centimètre cube vis-à-vis d'un sérum antitétanique étalon qui nous fut très gentiment envoyé par le Prof. Ramon, de l'Institut Pasteur de Paris. Des cobayes purs injectés avec 10 centimetre cubes de cette anatoxine devinrent, au bout d'un mois, capables de résister à l'inoculation de 100 D.M.M. de toxine tétanique.

c) *Doses.* — Les animaux furent injectés par voie hypodermique: le 1.er lot reçut d'abord 1 centimètre cube d'anatoxine, soit 7 unités floculantes, puis, au bout de sept jours, une nouvelle injection de 3 centimètres cubes d'anatoxine, soit 21 unités floculantes; au total, 28 unités floculantes. Le 2.e lot reçut 3 centimetres cubes d'anatoxine, soit 21 unités floculantes et, après une semaine, 7 centimetres cubes, soit 49 unités floculantes; au total, 10 centimètres cubes, soit 70 unités floculantes.

d) *Saignées.* — Tous les animaux furent saignés préalablement et l'on rechercha dans leur sérum l'antitoxine naturelle. Le 1.er lot subit des saignées, 10, 20, 50, 70, 100, 130, 150 et 190 jours après la dernière injection d'anatoxine. Les animaux du 2.e lot furent saignés 10, 30, 50, 80, 100, 130, 150 et 180 jours apres la derniere injection.

e) *Technique du dosage.* — Pour établir la croissance de la courbe antitoxique, nous employâmes la méthode de Ten Broeck et Bauer (28-31).

1.º Antigène employé pour le dosage. — Toxine tétanique sèche, obtenue par précipitation, au moyen du sulfate d'ammoniaque, du filtrat exempt de germes d'une culture de huit jours de Clostridium tetani, dans du bouillon coeur-de-veau, glycosé avec des morceaux de foie (semaine d'échantillons conservés depuis 1.931). Le filtrat, préalablement séche dans le vide sulfurique, fut conservé dans un sécheur Hempel en présence de chlorure de calcium et d'anhydride pentaphosphorique. La toxine fut triturée, tamisée et conservée, sous de l'anhydride pentaphosphorique mis dans une des branches d'un tube en U, de couleur ambre, l'autre branche contenant la toxine; aspiration par le vide d'un courant d'air seché par le chloure de calcium. Pendant toute la durée de nos

travaux, la D.M.L. de cette toxine fut 0gr.000005. Tous les étalonnages furent contrôlés avec 1 et 2 D.M.L. La mort chez les témoins survint dans un temps moyen de 84-108 heures avec 1 D.M.L. Etant données les faibles variations observées dans le moment de la mort, les témoins faits parallelement à chaque étalonnage des sérums ne furent pas enregistrés dans les tableaux des dosages.

2.º Animaux employés pour les dosages. — On prit des souris blanches, autant que possible de la même génération et d'un poids uniforme de 30 grammes. Des témoins furent faits pour chaque série d'injections.

3.º Techniques. — 0cmc.1 du sérum des animaux d'expériences fut mis en contact avec des D.M.L. variables, le volume était complété à 2 centimètres cubes avec de l'eau physiologique à 8 p.1.000 et pH-7,0. Les mélangens furent chauffés à 37ºC. pendant trente minutes et ensuite inoculés aux souris par voie sous-cutanée, *tout près de la queue.*

Ces inoculations ont été faites avec la collaboration de Mlle. Chloé de Lima, à qui nos presentons nos remerciements, ainsi qu'à Mlle. Ema de Lima.

TABLEAU V

Résultat des dosages des saignées préalables chez les animaux appartenant au Ier. lot

No. de l'animal	*Date de l'épreuve*	*Toxine*		*Souris*	
		en mgms.	*en D.M.L.*	*Poids*	*Résultat*
P. 31	7.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	7.VI.937	0,01	2 D.M.L.	30	M. 42 hs.
P. 233	7.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	S.
	7.VI.937	0,01	2 D.M.L.	30	M. 50 hs.
P. 304	7.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	7.VI.937	0,01	2 D.M.L.	30	M. 50 hs.
P. 7	7.VI.937	0,005	1 D.M.L.	300	M. 50 hs.
	7.VI.937	0,01	2 D.M.L.	30	M. 36 hs.
P. 232	7.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	7.VI.937	0,01	2 D.M.L.	30	M. 36 hs.
C. 263	7.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	7.VI.937	0,01	2 D.M.L.	30	M. 43 hs.
C. 313	7.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	M. 96 hs.
	7.VI.937	0,01	2 D.M.L.	30	M. 96 hs.
C. 251	7.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	7.VI.937	0,01	2 D.M.L.	30	M. 36 hs.
C. 295	7.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	7.VI.937	0,01	2 D.M.L.	30	M. 43 hs.
C. 311	7.VI.937	0.005	1 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	7.VI.937	0,01	2 D.M.L.	30	M. 50 hs.
C. 312	7.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	7.VI.937	0,01	2 D.M.L.	30	M. 36 hs.

1.re Saignée. — Cette saignée fut faite avant que les animaux d'expérience ne reçoivent l'antigène. A l'examen du tableau ci-dessus on peut constater que seul un préa présenta de l'immunité naturelle. 0cmc.1 de sérum protégeait une souris de 30 grammes contre 0.000005 de toxine, soit 1 D.M.L.

TABLEAU VI

Résultat des dosages dix jours après l'injection de 28 unités floculantes d'anatoxine tétanique

No. de l'animal	*Date de l'épreuve*	*Toxine*		*Souris*	
		en mgms.	*en D.M.L.*	*Poids*	*Résultat*
P. 31	15.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	S.
	15.VI.937	0,01	2 D.M.L.	30	M. 132 hs.
P. 238	15.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	S.
	15.VI.937	0,01	2 D.M.L.	30	S.
	24.VI.937	0,025	5 D.M.L.	30	(1
P. 304	15.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	15.VI.937	0,01	2 D.M.L.	30	M. 67 hs.
P. 7	15.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	15.VI.937	0,01	2 D.M.L.	30	M. 84 hs
P. 232	15.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	15.VI.937	0,01	2 D.M.L.	30	M. 50 hs
P. 262	15.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	S
	15.VI.937	0,01	2 D.M.L.	30	M. 132 hs
C. 313	15.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	S.
	15.VI.937	0,01	2 D.M.L.	30	S.
C. 251	15.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	S.
	15.VI.937	0,01	2 D.M.L.	30	M. 132 hs
C. 295	15.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	S.
	15.VI.937	0,01	2 D.M.L.	30	S.
C. 311	15.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	M. 108 hs
	15.VI.937	0,01	2 D.M.L.	30	M. 89 hs.
C. 312	15.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	S.
	15.VI.937	0,01	2 D.M.L.	30	M. 84 hs.

2.e Saignée. — Cette saignée fut pratiquée 10 jours après la deuxième injection d'anatoxine tétanique. Dans le tableau ci-dessus on peu constater que 2 des préas inoculés montrent déjà une faible immunité, de même que les cobayes, dont le degré d'immunité était légèrement plus élevé.

TABLEAU VII

Résultat des dosages vingt jours après l'injection de 28 unités floculantes d'anatoxine tétanique

No. de l'animal	*Date de l'épreuve*	*Toxine*		*Souris*	
		en mgms.	*en D.M.L.*	*Poids*	*Résultat*
P. 304	24.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	M. 96 hs.
	24.VI.937	0.01	2 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	24.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	S.
	24.VI.937	0,01	2 D.M.L.	30	S.
P. 238	4. I.937	0.05	10 D.M.L.	30	M. 60 hs.
	2. I.937	0.10	20 D.M.L.	30	M. 60 hs.
	2. I.937	0.25	50 D.M.L.	30	M. 60 hs.
	2. I.937	0,50	100 D.M.L.	30	M. 60 hs.
P. 232	24.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	24.VI.937	0.01	2 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	4. I.937	0,005	1 D.M.L.	30	M. 50 hs.
P. 7	24.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	24.VI.937	0.01	2 D.M.L.	30	M. 108 hs.
P. 31	24.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	S.
	24.VI.937	0.01	2 D.M.L.	30	M. 84 hs.
C. 311	24.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	M. 132 hs.
	24.VI.937	0.01	2 D.M.L.	30	M. 84 hs.
C. 312	24.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	S.
	24.VI.937	0.01	2 D.M.L.	30	S.
C. 313	24.VI.937	0,005	10 D.M.L.	30	S.
	24.VI.937	0.01	1 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	4. I.937	0.05	2 D.M.L.	30	M. 60 hs.
C. 295	24.VI.937	0,005	10 D.M.L.	30	S
	24.VI.937	0.01	1 D.M.L.	30	M. 96 hs.
	4. I.937	0.05	2 D.M.L.	30	M. 84 hs.
C. 251	24.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	S
	24.VI.937	0.01	2 D.M.L.	30	S.
C. 262	24.VI.937	0,005	1 D.M.L.	30	S
	24.VI.937	0.01	2 D.M.L.	30	S.
	4 I.937	0.05	10 D.M.L.	30	S.

3.º Saignée. — Cette saignée fut pratiquée vingt jours après la deuxième injection d'antigène. On peut constater que les résultats des titragens effectués vingt jours après l'administration aux animaux de la deuxième dose d'antigène, sont peu différents de ceux obtenus dix jours après l'injection de la deuxième dose.

TABLEAU VIII

Résultat des dosages cinquante jours après l'injection de 28 unités floculantes d'anatoxine tétanique

No. de l'animal	*Date de l'épreuve*	*Toxine*		*Souris*	
		en mgms.	*en D.M.L.*	*Poids*	*Résultat*
P. 31	23.VII.937	0.005	1 D.M.L.	30	S.
	23.VII.937	0.01	2 D.M.L.	30	S.
	23.VII.937	0.025	5 D.M.L.	30	S.
	4. I.938	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	23.VII.937	0.005	1 D.M.L.	30	S.
	23.VII.937	0.01	2 D.M.L.	30	S.
	23.VII.937	0.025	5 D.M.L.	30	S.
P. 238	4. I.938	0.05	10 D.M.L.	30	S.
	4. I.938	0.10	20 D.M.L.	30	S.
	4. I.938	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	2. II.938	0.50	100 D.M.L.	30	S.
	23.VII.937	0.005	1 D.M.L.	30	S.
	23.VII.937	0.01	2 D.M.L.	30	S.
P. 304	23.VII.937	0.025	5 D.M.L.	30	S.
	4. II.938	0.10	20 D.M.L.	30	M. 103 hs.
P. 232	23.VII.937	0.005	1 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	23.VII.937	0.005	2 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	23.VII.937	0.025	5 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	23.VII.937	0.005	1 D.M.L.	30	S.
	23.VII.937	0.01	2 D.M.L.	30	S.
	23.VII.937	0.025	5 D.M.L.	30	S.
P. 262	4. I.938	0.05	10 D.M.L.	30	S.
	4. I.938	0.10	20 D.M.L.	30	S.
	4. I.938	0.025	50 D.M.L.	30	S.
	4. I.938	0.50	100 D.M.L.	30	M. 103 hs.
	23.VII.937	0.005	1 D.M.L.	30	S.
	23.VII.937	0.01	2 D.M.L.	30	S.
C. 313	23.VII.937	0.025	5 D.M.L.	30	S.
	4. I.938	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	2. II.938	0.50	100 D.M.L.	30	S.
	23.VII.937	0.005	1 D.M.L.	30	S.
	23.VII.937	0.01	2 D.M.L.	30	S.
	23.VII.937	0.025	5 D.M.L.	30	S.

TABLEAU VIII

Résultat des dosages cinquante jours après l'injection de 28 unités floculantes d'anatoxine tétanique

N. de l'animal	Date de l'épreuve	Toxine		Souris	
		em Mgms.	en D.M.L.	Poids	Résultat
C. 251	4. 1.938	0,05	10 D.M.L.	30	S.
	4. 1.938	0.10	20 D.M.L.	30	S.
	4. 1.938	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	2. 11.938	0,40	80 D.M.L.	30	S.
	2. 11.938	0.50	100 D.M.L.	30	S.
	2. 11.938	1 00	200 D.M.L.	30	S.
	23.VII.937	0.005	1 D.M.L.	30	S.
	23.VII.937	0.01	2 D.M.L.	30	S.
C. 295	23.VII.937	0.025	5 D.M.L.	30	S.
	4. 1.938	0.05	10 D.M.L.	30	S.
	4. 1.938	0.10	20 D.M.L.	30	S.
	4. 1.938	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	23.VII.937	0.005	1 D.M.L.	30	S.
C. 311	23.VII.937	0.01	2 D.M.L.	30	M. 108 hs.
	23.VII.937	0.025	5 D.M.L.	30	M. 108 hs.
	23.VII.937	0.005	1 D.M.L.	30	S.
	23.VII.937	0.01	2 D.M.L.	30	S.
C. 312	23.VII.937	0,25	5 D.M.L.	30	S.
	4. 1.938	0.10	10 D.M.L.	30	S.
	4. 1.938	0.05	20 D.M.L.	30	S.
	4. 1.938	0,25	50 D.M.L.	30	S.

Cette saignée fut pratiquée cinquante jours après la deuxième injection d'anatoxine. Il y a, comparativement aux résultats du tableau VII, une différence remarquable; à l'exception du preá n.° 232, qui ne s'immunisa pas, tous les preás ainsi que les cobayes montrerent une nette réponse à la sollicitation antigénique au moyen de 28 unités floculantes d'anatoxine tétanique. Un seul preá continuait à ne pas répondre à la solicitation antigénique, tous les autres étant protégés contre plus de 200 D.M.L.

TABLEAU IX

Résultat des dosages soixante-dix jours après l'injection de 28 unités floculantes d'anatoxine tétanique

No. de l'animal	*Date de l'épreuve*	*Toxine*		*Souris*	
		en mgms.	*en D.M.L.*	*Poids*	*Résultat*
P. 31	12.VIII.37	0.25	50 D.M.L.	30	S.
	12.VIII.37	0.50	100 D.M.L.	30	S.
	4. 1.38	0.75	150 D.M.L.	30	S.
	12.VIII.37	0.25	50 D.M.L.	30	S.
P. 238	12.VIII.37	0.50	100 D.M.L.	30	S.
	4. 1.38	0.75	150 D.M.L.	30	S.
	4. 1.38	1.00	200 D.M.L.	30	M. 108 hs
	12.VIII.37	0.25	50 D.M.L.	30	M. 84 hs
P. 304	12.VIII.37	0.50	100 D.M.L.	30	M. 36 hs
	4. 1.38	0.10	20 D.M.L.	30	S.
	22. XI.37	0.005	1 D.M.L.	30	M. 86 hs
P. 232	12.VIII.37	0.25	50 D.M.L.	30	M. 36 hs
	12.VIII.37	0.25	100 D.M.L.	30	M. 36 hs
	12.VIII.37	0.50	50 D.M.L.	30	S.
C. 262	12.VIII.37	0.75	100 D.M.L.	30	S.
	4. 1.38	1.00	150 D.M.L.	30	S.
	4. 1.38	0.25	200 D.M.L.	30	M. 72 hs
	12.VIII.37	0.50	50 D.M.L.	30	S.
	12.VIII.37	0.75	100 D.M.L.	30	S.
C. 313	4. 1.38	1.25	150 D.M.L.	30	S.
	4. 1.38	1.50	250 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	2.00	300 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	2.50	400 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	0.25	500 D.M.L.	30	S.
C. 251	12.VIII.37	0.50	50 D.M.L.	30	S.
	12.VIII.37	0.25	100 D.M.L.	30	M 84 hs
C. 295	12.VIII.37	0.50	50 D.M.L.	30	S.
	12.VIII.37	0.01	100 D.M.L.	30	S
	4. 1.38	0.05	2 D.M.L.	30	S.
C. 311	12.VIII.37	0.25	10 D.M.L.	30	M. 84 hs
	12.VIII.37	0.25	50 D.M.L.	30	M 84 hs
C. 312	12.VIII.37	0.50	50 D.M.L.	30	S.
	12.VIII.37	0.50	100 D.M.L.	30	M. 84 hs

5.° Saignée. — Les animaux furent saignés soixante-dix jours apres l'administration de 28 unités d'anatoxine tétanique. On peut constater la courbe d'antitoxine s'éleve toujours. Le sérum d'un des cobayes, a la dose de 0cmc.1 protégea la souris contre 2 mgr.50, soit 500 D.M.L. de la toxine.

TABLEAU X

Résultat des dosages cent jours après l'injection de 28 unités floculantes d'anatoxine tétanique

No. de l'animal	Date de l'épreuve	Toxine en Mgms.	Toxine en D.M.L.	Souris Poids	Souris Résultat
P. 31	31.VIII.37	1.0	200 D.M.L.	30	M. 108 hs.
	31.VIII.37	1,5	300 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	2. II.38	1,75	350 D.M.L.	30	M. 60 hs.
	2. II.38	2,00	400 D.M.L.	30	M. 60 hs.
	2. II.38	2,50	500 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	2. II.38	3,00	600 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	2. II.38	0,75	150 D.M.L.	30	S.
P. 238	31.VIII.37	1,00	200 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	31.VIII.37	1,50	300 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	2. II.38	2,0	400 D.M.L.	30	M. 48 hs.
	2. II.38	0,25	50 D.M.L.	30	M. 36 hs.
P. 304	31.VIII.37	0,50	100 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	31.VIII.37	1.0	200 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	31.VIII.37	0 005	1 D.M.L.	30	M. 86 hs.
P. 232	31.VIII.37	0.05	10 D.M L.	30	M. 36 hs.
	31.VIII.37	0,25	50 D.M.L.	30	M. 36 hs.
C. 262	31.VIII.37	1.5	200 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	1.0	300 D.M.L.	30	M. 108 hs.
	31.VIII.37	1.0	200 D.M.L.	30	M. acidente
	31.VIII.37	1.5	300 D.M.L.	30	S.
C. 313	2. II.38	2,0	400 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	2.5	500 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	4.0	800 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	5.0	1.000 D.M.L.	30	M. 108 hs.
C. 251	31.VIII.37	0.5	100 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	1.0	200 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	31.VIII.37	1.00	200 D.M.L.	30	M. 84 hs.
C. 295	31.VIII.37	1.50	300 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	2. II.38	0.75	150 D.M.L.	30	S.
C 311	31.VIII.37	0,05	10 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	0,25	50 D.M.L.	30	M. 84 hs.
C 312	31.VIII.37	0,5	100 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	1.0	200 D.M.L.	30	M. 36 hs.

6.° Saignée. — Le sang fut prélevé cent jours après l'administration aux animaux de 28 unités floculantes d'anatoxine tétanique. Chez deux des cobayes la courbe antitoxique atteint à ce moment le maximum: le sérum du C.313, à la dose de 0cmc.1, protégea la souris contre un maximum de 150 D.M.L. de to-

xine. Chez les préas, à l'exception du *n.°* 232, la courbe antitoxique continuait à monter.

TABLEAU XI

Résultat des dosages cent trente jours après l'injection de 28 unités floculantes d'anatoxine tétanique

No. de l'animal	*Date de l'épreuve*	*Toxine*		*Souris*	
		en Mgms.	*en D.M.L.*	*Poids*	*Résultat*
P. 31	3.XI.37	1,50	300 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	1,75	350 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	2,00	400 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	25.XI.37	2,25	450 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	3.XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	1,0	200 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	1,25	250 D.H.L.	30	S.
P. 238	25.XI.37	1,50	300 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	1,75	350 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	2,25	450 D.M.L.	30	M. 108 hs.
	2. II.38	0,40	50 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,25	80 D.M.L.	30	
P. 304	3.XI.37	0,50	100 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	M. 24 hs.
	25.XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	M. 24 hs.
P. 232	3.XI.37	0,010	2 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,025	5 D.M.L.	30	M. 48 hs.
	3.XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	1,25	250 D.H.L.	30	S.
	25.XI.37	1,50	300 D.M.L.	30	S.
C. 262	25.XI.37	1,75	350 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	2,25	450 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	2,50	500 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	3,00	600 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	1,25	250 D.M.L.	30	S.
C. 313	25.XI.37	1,75	350 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	2,00	400 D.M.L.	30	M. 108 hs.
	3.XI.37	2,50	500 D.M.L.	30	M. 108 hs.
	3.XI.37	3,00	600 D.M.L.	30	M. 60 hs.
	3.XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	S.
C. 251	25.XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	1,25	250 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	1,50	300 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	1,00	200 D.M.L.	30	S.

TABLEAU XI

Résultats des dosages cent trente jours après l'injection de 28 unités floculantes d'anatoxine tétanique

No. de l'animal	Date de l'épreuve	Toxine		Souris	
		em Mgms.	en D.M.L.	Poids	Résultat
C. 295	3.XI.37	1,50	300 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	1,75	350 D.M.L.	30	M. 44 hs.
	25.XI.37	2,00	400 D.M.L.	30	M. 48 hs.
C. 311	3.XI.37	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,50	100 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	0,10	20 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	0,25	50 D.M.L.	30	S.
C. 312	2. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	M. 108 hs.
	3.XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	M. 108 hs.

7.° Saignée. — Le sang fût prélevé cent-trente jours après l'administration aux animaux de 28 unités floculantes d'anatoxine tétanique. Chez trois cobayes de ce lot, nos. 262, 295 et 251, la courbe antitoxique atteint alors son maximum, 0cmc.1 de leur sérum protégeant la souris contre 500, 80, 125 et 300 D.M.L. On peut donc constater que par une simulation antigénique faible l'immunisation se fait un peu mieux et plus rapidement chez les cobayes que chez les preás; ceux-ci présentent toute-fois une moyenne d'immunisation plus uniforme. L'absence d'immunité chez un des preás, n.° 232, indique que les expériences doivent être reprises avec un nombre plus grand d'animaux. Le preá n. 238, celui qui à la saignée préliminaire montra qu'il possédait des anticorps naturels, fut de tous le mieux immunisé.

TABLEAU XII

Résultat des dosages cent-cinquante jours après l'injection de 28 unités floculantes d'anatoxine tétanique

No. de l'animal	*Date de l'épreuve*	*Toxine*		*Souris*	
		en Mgms.	*en D.M.L.*	*Poids*	*Résultat*
P. 31	2. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	1,0	200 D.M.L.	30	M. 108 hs.
	27. XI.37	1,25	250 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	27. XI.37	1,50	300 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	27. XI.37	1,75	350 D.M.L.	30	M. 36 hs.
P. 238	27. XI.37	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	27. XI.37	2,50	500 D.M.L.	30	M. 36 hs.
P. 304	27. XI.37	0,50	100 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	27. XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	2. II.38	0,005	1 D.M.L.	30	M. 36 hs.
P. 232	2. II.38	0,01	2 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	27. XI.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	27. XI.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	3.XII.37	1,50	300 D.M.L.	30	M. 60 hs.
	3.XII.37	1,75	350 D.M.L.	30	M. 36 hs.
C. 262	27. XI.37	2,00	400 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	27. XI.37	2,25	450 D.M.L.	30	M. 24 hs.
	27. XI.37	2,50	500 D.M.L.	30	M. 24 hs.
	27. XI.37	0,25	50 D.M.L.	30	M. 36 hs.
C. 313	27. XI.37	0,50	100 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	2. II.38	1 75	350 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	27. XI.37	0,75	350 D.M.L.	30	M. 50 hs.
C. 251	27. XI.37	2,00	400 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	27. XI.37	2,25	500 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	2. II.38	1,00	200 D.M.L.	30	S.
C. 295	3.XII.37	1,50	300 D.M.L.	30	M. 60 hs.
	27. XI.37	1,75	350 D.M.L.	30	M 36 hs.
	27. XI.37	2,00	400 D.M.L.	30	M. 30 hs.
C. 311	27. XI.37	0,25	50 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	27. XI.37	0,50	100 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	2. II.38	0,50	10 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	0,25	50 D.M.L.	30	M. 156 hs.
C. 312	2. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	M. 60 hs.
	27. XI.37	0,50	100 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	27. XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	M. 36 hs.

8.ª Saignée. — Cette saignée fut pratiquée cent-cinquante jours après l'injection de la deuxième dose d'antigene. Aussi bien chez les préas que chez les cobayes, la courbe d'immunisation par l'anatoxine tétanique commençait à descendre cinq mois après l'injection de 28 unités floculantes.

TABLEAU XIII

Résultat des dosages cent-quatre-vingt-dix jours après l'injection de 28 unités floculantes d'anatoxine tétanique

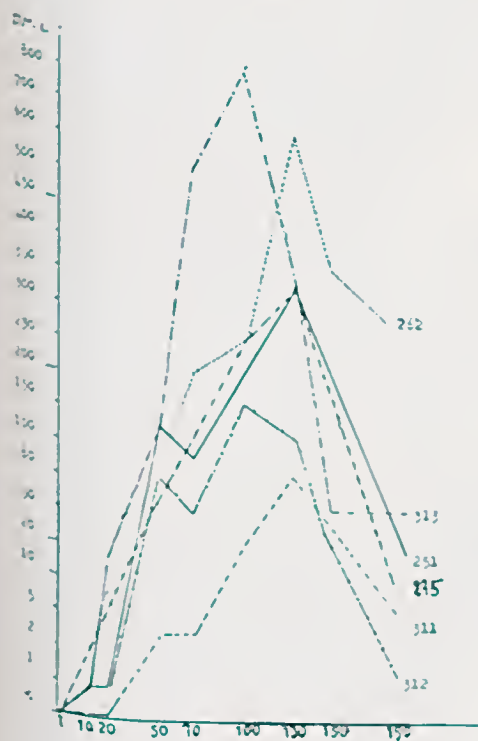
No. de l'animal	*Date de l'épreuve*	*Toxine*		*Souris*	
		en Mgms.	*en D.M.L.*	*Poids*	*Résultat*
P. 31	2. II.38	0,10	20 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	1,00	200 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	3.XII.37	1,50	300 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	2. II.38	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	S.
P. 238	2. II.38	1,50	300 D.M.L.	30	M. 48 hs.
	3.XII.37	1,50	300 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	3.XII.37	2,00	400 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	2. II.38	0,05	10 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	0,1	20 D.M.L.	30	M. 60 hs.
P. 304	3.XII.37	0,125	25 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	3.XII.37	0,25	50 D.M.L.	30	M. 19 hs.
	2. II.38	0,005	1 D.M.L.	30	M. 48 hs.
P. 232	2. II.38	0,01	2 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	3.XII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	3.XII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	2. II.38	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	1,0	200 D.M.L.	30	S.
C. 262	22. II.38	1,25	250 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	0,50	300 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	3.XII.37	1,75	350 D.M.L.	30	M. 12 hs.
	2. II.38	0,10	20 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	0,25	50 D.M.L.	30	S.
C. 313	2. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	M. 108 hs.
	3.XII.37	1,0	200 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	3.XII.37	1,50	300 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	2. II.38	0,25	50 D.M.L.	30	S.
C. 251	3.XII.37	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	1,0	200 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	0,10	20 D.M.L.	30	M. 144 hs.
	2. II.38	0,25	50 D.M.L.	30	M. 72 hs.

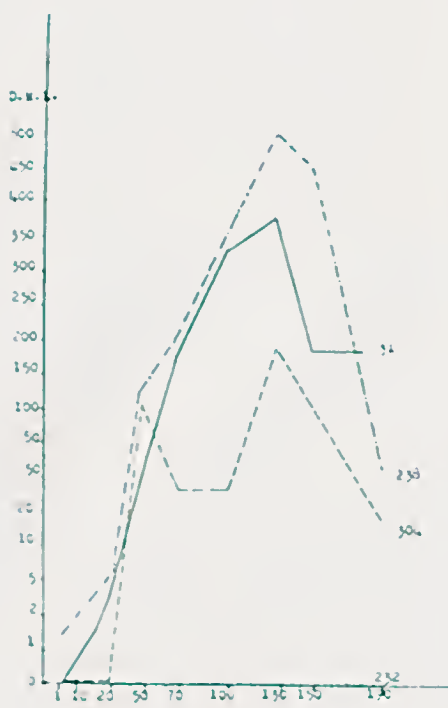
TABLEAU XIII

Résultat des dosages cent-quatre-vingt-dix jours après l'injection de 28 unités floculantes d'anatoxine têtanique

No. de l'animal	*Date de l'épreuve*	*Toxine*		*Souris*	
		em Mgms.	*en D.M.L.*	*Poids*	*Résultat*
C. 295	2. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	M. 24 hs.
	3.XII.37	1,00	200 D.M.L.	30	M. 12 hs.
	3.XII.37	1,50	300 D.M.L.	30	M. 12 hs.
	22. II.38	0.005	1 D.M.L.	30	S.
	22. II.38	0,01	2 D.M.L.	30	S.
C. 311	2. II.38	0,025	5 D.M.L.	30	S.
	2. II.38	0.05	10 D.M.L.	30	M. 60 hs.
	3.XII.37	0,125	25 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	3.XII.37	0.250	50 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	22. II.38	0.005	1 D.M.L.	30	S.
	22. II.38	0,01	2 D.M.L.	30	M. 156 hs.
	22. II.38	0.025	5 D.M.L.	30	M. 156 hs.
C. 312	2. II.38	0.05	10 D.M.L.	30	M. 156 hs.
	2. II.38	0,10	20 D.M.L.	30	M. 108 hs.
	3.XII.37	0.125	25 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	3.XII.37	0.250	50 D.M.L.	30	M. 36 hs.

9.º Saignée. — Cette saignée fut pratiquée cent quatre-vingt-dix jours après l'injection de l'antigène. On peut constater que la courbe antitoxique s'abaisse toujours, atteignant des limites inférieures plus rapidement chez les cobayes que chez les preás: ceux-ci s'immunisent plus lentement leur immunité est plus faible, mais leur sérum conserve un titre antitoxique plus élévé et plus durable

Graph. I

Courbe d'immunisation des cobayes ayant reçu 28 unités floculantes d'anatoxine tétanique.

Graph. II

Courbe d'immunisation des preás ayant reçu 28 unités floculantes d'anatoxine tétanique.

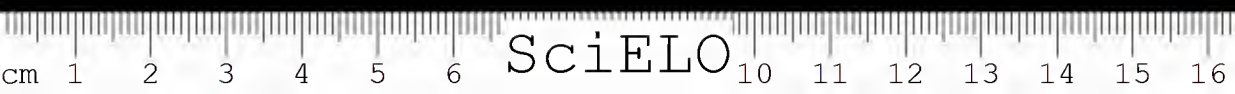



TABLEAU XIV

Résultat des dosages saignées préliminaires chez les animaux appartenant au lot 2

No. de l'animal	*Date de l'épreuve*	*Toxine*		*Souris*	
		en Mgms.	*en D.M.L.*	*Poids*	*Résultat*
P. 15	5.VII.37 5.VII.37	0,005 0.01	1 D.M.L. 2 D.M.L.	30 30	M. 84 hs. M. 36 hs.
P. 20	5.VII.37 5.VII.37	0,005 0.01	1 D.M.L. 2 D.M.L.	30 30	M. 48 hs. M. 36 hs.
P. 28	5.VII.37 5.VII.37	0,005 0.01	1 D.M.L. 2 D.M.L.	30 30	M. 50 hs. accident
P. 37	5.VII.37 5.VII.37	0,005 0.01	1 D.M.L. 2 D.M.L.	30 30	M. 48 hs. M. 48 hs.
P. 303	5.VII.37 5.VII.37	0,005 0.01	1 D.M.L. 2 D.M.L.	30 30	M. 48 hs. M. 48 hs.
C. 271	5.VII.37 5.VII.37	0,005 0.01	1 D.M.L. 2 D.M.L.	30 30	accident M. 50 hs.
C. 273	5.VII.37 5.VII.37	0,005 0,01	1 D.M.L. 2 D.M.L.	30 30	M. 48 hs. M. 48 hs.
C. 274	5.VII.37 5.VII.37	0,005 0.01	1 D.M.L. 2 D.M.L.	30 30	M. 84 hs. M. 36 hs.
C. 308	5.VII.37 5.VII.37	0,005 0.01	1 D.M.L. 2 D.M.L.	30 30	M. 50 hs. M. 36 hs.
C. 329	5.VII.37 5.VII.37	0,005 0.01	1 D.M.L. 2 D.M.L.	30 30	M. 50 hs. M. 36 hs.

Comme dans la première série, cette saignée fut faite préalablement à l'immunisation, dans le but de constater si le sérum des préas et des cobayes possédait de l'antitoxine d'origine naturelle.

Aucun des sérums des animaux ne contenait l'antitoxine naturelle à un taux suffisant pour protéger, à la dose de 0cmc.1, la vie de souris inoculées avec 1 et 2 D.M.L. de toxine.

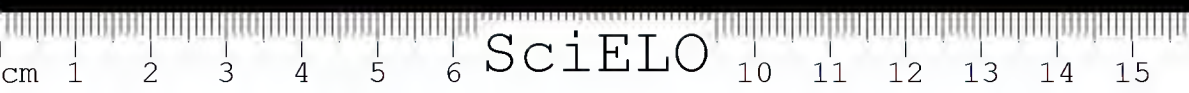



TABLEAU XV

Résultat des dosages dix jours après l'injection de 70 unités floculantes d'anatoxine tétanique

No. de l'animal	*Date de l'épreuve*	*Toxine*		*Souris*	
		en Mgms.	*Résultat*	*Poids*	*en D.M.L.*
P. 15	23.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	S.
	23.VII.37	0.01	2 D.M.L.	30	S.
P. 20	23.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	S.
	23.VII.37	0.01	2 D.M.L.	30	S.
P. 28	23.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 32 hs.
	23.VII.37	0.01	2 D.M.L.	30	M. 84 hs.
P. 37	23.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	23.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 50 hs.
P. 303	23.VII.37	0.005	1 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	23.VII.37	0.01	2 D.M.L.	30	M. 50 hs
C. 271	23.VII.37	0.005	1 D.M.L.	30	M. 100 hs.
	23.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 108 hs.
C. 273	23.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	23.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 84 hs.
C. 274	23.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	23.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 108 hs.
C. 308	23.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	23.VII.37	0.01	2 D.M.L.	30	M. 50 hs.
C. 329	23.VII.37	0,005	1 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	23.VII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 36 hs.

Cette saignée fut pratiquée dix jours après l'injection de 70 U. floculantes d'anatoxine tétanique. Chez deux préas, nos. 15 et 20, la quantité d'antitoxine contenue dans le sérum suffisait pour protéger la souris contre 1 et 2 D.M.L. de toxine tétanique. Aucun des cobayes inoculés ne fut capable de produire, dans cette courte période, de l'antitoxine en quantité suffisante pour protéger les souris contre les mêmes D.M.L.

TABLEAU XVI

Résultat des dosages trente jours après l'injection de 70 unités floculantes d'anatoxine tétanique

No. de l'animal	*Date de l'épreuve*	*Toxine*		*Souris*	
		en Mgms.	*en D.M.L.*	*Poids*	*Résultat*
P. 15	12.VIII.37	0,01	2 D.M.L.	30	S.
	12.VIII.37	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	1,50	300 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	3,00	600 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	4,50	900 D.M.L.	30	S.
P. 20	12.VIII.37	0,025	5 D.M.L.	30	S.
	12.VIII.37	0,05	10 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	1,50	300 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	2,50	500 D.M.L.	30	S.
P. 28	12.VIII.37	0,01	2 D.M.L.	30	S.
	12.VIII.37	0,025	5 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	S.
P. 37	12.VIII.37	0,01	2 D.M.L.	30	S.
	12.VIII.37	0,025	5 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,05	10 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	4,00	800 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	5,00	1.000 D.M.L.	30	S.
P. 303	12.VIII.37	0,01	2 D.M.L.	30	M. 132 hs.
	12.VIII.37	0,025	5 D.M.L.	30	M. 108 hs.
	15. II.38	0,40	80 D.M.L.	30	M. 48 hs.
	15. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	M. 24 hs.
C. 271	12.VIII.37	0,01	2 D.M.L.	30	S.
	12.VIII.37	0,025	5 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	4,00	800 D.M.L.	30	M. 36 hs.
C. 273	12.VIII.37	0,01	2 D.M.L.	30	S.
	12.VIII.37	0,025	5 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,10	20 D.M.L.	30	S.
C 274	12.VIII.37	0,01	2 D.M.L.	30	S.
	12.VIII.37	0,025	5 D.M.L.	30	S.
C. 329	12.VIII.37	0,01	2 D.M.L.	30	S.
	12.VIII.37	0,025	5 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,05	10 D.M.L.	30	S.

Saignée faite trente jours après l'injection de l'anatoxine tétanique: 70 unités floculantes produisirent, chez les cobayes et les préas, une immunité beaucoup plus rapide et plus intense que 28 U. floculantes.

Chez le préa n.° 37 la courbe antitoxique atteint au bout de si peu de temps le maximum: 0cmc.1 du sérum de ce préa protege la souris contre 1.200 D.M.L. Le sérum de 2 preás, nos. 15 et 20, protège la souris contre 1.200 D.M.L. Le sérum de 2 preás, ns. 15 et 20, protège la souris respectivement contre plus de 900 et 500 D.M.L.

TABLEAU XVII

Résultat des dosages cinquante jours après l'injection de 70 unités floculantes d'anatoxine tétanique

No. de l'animal	*Date de l'épreuve*	*Toxine*		*Souris*	
		en Mgms.	*en D.M.L.*	*Po ds*	*Résultat*
P. 15	31.VIII.37	0,50	100 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	1,50	300 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	2,50	500 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	5,00	1000 D.M.L.	30	S.
P. 20	31.VIII.37	0.25	50 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	0.50	100 D.M.L.	30	S.
	16. II.38	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	16. II.38	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	22. II.38	5,00	1000 D.M.L.	30	S.
P. 28	31.VIII.37	0 25	10 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	00.05	50 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,40	80 D.M.L.	30	S.
	22. II.38	0,05	400 D.M.L.		
P. 37	31.VIII.37	2,00	10 D.M.L.	30	•S.
	31.VIII.37	0.25	50 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	4,00	800 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	5,00	1000 D.M.L.	30	M. 48 hs.
P. 303	31.VIII.37	0,05	10 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	0.10	20 D.M.L.	30	S.
C. 271	31.VIII.37	0,05	10 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	0 25	50 D.M.L.	30	S.
	22. II.38	2.00	400 D.M.L.	30	S.
	22. II.38	4,00	800 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	7,50	1500 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	10.00	2000 D.M.L.	30	S.
	26. II.38	15,00	3000 D.M.L.	30	S.

TABLEAU XVII

Résultat des dosages cinquant jours après l'injection de 70 unités floculantes d'anatoxine tétanique

N.º de l'animal	*Date de l'épreuve*	*Toxine*		*Souris*	
		em Mgms.	*en D.M.L.*	*Poids*	*Résultat*
C. 273	31.VIII.37	0,05	10 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,40	80 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	1,50	300 D.M.L.	30	S.
	22. II.38	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	22. II.38	2,50	500 D.M.L.	30	S.
	16. II.38	3,50	700 D.M.L.	30	S.
	16. II.38	4,00	800 D.M.L.	30	M. 12 hs.
C. 274	31.VIII.37	0,05	10 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,40	80 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	1,50	300 D.M.L.	30	S.
C. 329	31.VIII.37	0,05	10 D.M.L.	30	S.
	31.VIII.37	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,40	80 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	1,50	300 D.M.L.	30	M. 24 hs.

Saignée faite cinquante jours après l'injection de la deuxième dose d'antigène. Chez tous les cobayes injectés la courbe antitoxique atteint uniformément le maximum à cette date. Le sérum d'un des cobayes, à la dose de 0cmc.1 protégea la souris contre 3.000 D.M.L., tandis qu'au début cette quantité ne suffisait pas même pour protéger contre 1 D.M.L. Les cobayes sont donc sensibles à une stimulation antigenique plus forte. Chez deux preás, nos. 15 et 20, la courbe antitoxique atteint également le maximum, 0cmc.1 de leur sérum protégeant la souris contre 1.000 D.M.L. Des souris injectés avec des doses plus fortes présenterent des symptômes de tétanos. Chez le preá n.º 37 le titre antitoxique avait déja considérablement baissé.

TABLEAU XVIII

Résultat des dosages quatre-vingt jours après l'injection de 70 unités floculantes d'anatoxine tétanique

No. de l'animal	*Date de l'épreuve*	*Toxine*		*Souris*	
		en Mgms.	*en D.M.L.*	*Poids*	*Résultat*
P. 28	3.XI.37	0.40	80 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,50	100 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,40	80 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,50	100 D.M.L.	30	S.
P. 37	25.XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,25	50 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,40	80 D.M.L.	30	S.
P. 303	25.XI.37	0,50	100 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,40	80 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,50	100 D.M.L.	30	S.
C. 271	25.XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,40	80 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0,50	100 D.M.L.	30	S.
C. 274	25.XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0.40	80 D.M.L.	30	S.
	3.XI.37	0.50	100 D.M.L.	30	S.
C. 329	25.XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	S.
	25.XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	S.

Saignée faite quatre-vingts jours après l'injection de l'antigène. Chez les cobayes le titre antitoxique s'abaisse plus lentement encore que dans les expériences antérieures. Au contraire, on peut constater une élévation progressive et lente de la teneur antitoxique du sérum chez deux preás.

Note: Le cobaye n. 273 ne fut pas saigné. Les preás ns. 15 et 20 moururent pour avoir reçu une mauvaise alimentation.

TABLEAU XIX

Résultat des dosages cent jours après l'injection de 70 unités floculantes d'anatoxine tétanique

No. de l'animal	*Date de l'épreuve*	*Toxine*		*Souris*	
		en Mgms.	*en D.M.L.*	*Poids*	*Résultat*
	27. XI.37	0,75	150 D.M.L.	30	S.
P. 28	27. XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	27. XI.37	1,50	300 D.M.L.	30	M. 24 hs.
	27. XI.37	1,50	300 D.M.L.	30	S.
P. 303	27. XI.37	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	27. XI.37	2,50	500 D.M.L.	30	S.
	27. XI.37	1,50	300 D.M.L.	30	S.
	27. XI.37	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	27. XI.37	2,50	500 D.M.L.	30	S.
C. 271	3.XII.37	3,00	600 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	3,50	700 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	4,00	800 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	5,00	1.000 D.M.L.	30	S.
	27. XI.37	0,50	100 D.M.L.	30	S.
	27. XI.37	1,00	200 D.M.L.	30	S.
	27. XI.37	1,50	300 D.M.L.	30	S.
C. 273	3.XII.37	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	2,50	500 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	3,00	600 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	27. XI.37	1,50	300 D.M.L.	30	S.
C. 274	27. XI.37	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	27. XI.37	2,50	500 D.M.L.	30	S.
	27. XI.37	1,50	300 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	27. XI.37	2,00	400 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	27. XI.37	2,50	500 D.M.L.	30	M. 12 hs.
C. 329	3.XII.37	1,25	250 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	3.XII.37	1,00	200 D.M.L.	30	M. 48 hs.
	15. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	M. 36 hs.

Saignée faite cent jours après l'injection de l'antigène. Comme dans le dosage antérieur, la chute du titre antitoxique chez les cobayes s'accentue lentement, tandis que chez deux des préas la teneur antitoxique du sérum s'élève progressivement.

Observation: Le preá n.° 37 mourut à la suite d'une mauvaise alimentation.

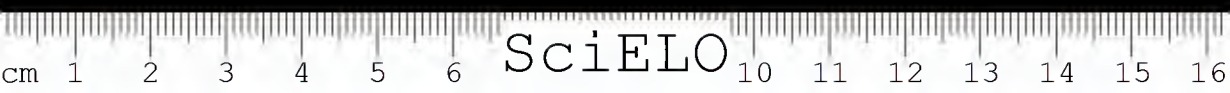



TABLEAU XX

Résultat des dosages cent trente jours après l'injection de 70 unités floculantes d'anatoxine tétanique

No. de l'animal	*Date de l'épreuve*	*Toxine*		*Souris*	
		en Mgms.	*en D.M.L*	*Poids*	*Résultat*
P. 28	3.XII.37	1,00	200 D.M..L	30	S.
	3.XII.37	1,50	300 D.M.L.	30	S.
	16. II.38	2.00	400 D.M.L.	30	S.
	16. II.38	3,00	600 D.M.L.	30	S.
	16. II.38	3,50	700 D.M.L.	30	S.
	22. II.38	5,00	1000 D.M.L.	30	M. 48 hs.
P. 303	3.XII.37	2,50	500 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	3.00	600 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	3,25	650 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	3,50	700 D.M.L.	30	M. 24 hs.
C. 271	3.XII.37	2,50	500 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	3,00	600 D.M.L.	30	S.
	15. II.38	4,00	800 D.M.L.	30	S.
C. 273	3.XII.37	2,00	400 D.M.L.	30	S.
	3.XII.37	2.50	500 D.M.L.	30	S.
C. 329	15. II.38	0,25	50 D.M.L.	30	M. 48 hs.
	15. II.38	0,50	100 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	3.XII.37	1,00	200 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	3.XII.37	1,50	300 D.M.L.	30	M. 24 hs.

Saignée pratiquée cent trente jours après l'injection de l'antigène. La courbe antitoxique du préa n.º 28 n'atteignit qu'a ce moment son maximum. 0cmc.1 de son sérum protégeait la souris contre 1.200 D.M.L. de toxine. Chez le preá n.º 303 le titre antitoxique du sérum continue à s'élever.

TABLEAU XXI

Résultat des dosages cent cinquante jours après l'injection de 70 unités floculantes d'anatoxine tétanique

No. de l'animal	*Date de l'épreuve*	*Toxine*		*Souris*	
		en Mgms.	*en D.M.L.*	*Poids*	*Résultat*
	4. I.38	2,50	500 D.M.L.	30	S.
P. 28	4. I.38	3,00	600 D.M.L.	30	S.
	4. I.38	3,50	700 D.M.L.	30	S.
	22.II.38	4,00	800 D.M.L.	30	M. 36 hs.
P. 303	4. I.38	2,50	500 D.M.L.	30	S.
	4. I.38	3,00	600 D.M.L.	30	M. 84 hs.
	4. I.38	2,50	500 D.M.L.	30	S.
	4. I.38	3,00	600 D.M.L.	30	S.
C. 271	4. I.38	4,00	800 D.M.L.	30	S.
	16.II.38	5,00	1000 D.M.L.	30	M. 12 hs.
	4. I.38	2,50	500 D.M.L.	30	S.
C. 273	4. I.38	3,00	600 D.M.L.	30	M. 50 hs.
	4. I.38	4,00	800 D.M.L.	30	M. 36 hs.
	4. I.38	0,10	20 D.M.L.	30	S.
C. 329	4. I.38	0,25	50 D.M.L.	30	M. 48 hs.
	3. I.38	0,50	100 D.M.L.	30	M. 20 hs.

Saignée faite cent-cinquante jours après l'injection de l'antigene. La teneur en antitoxine du preá n.° 303 atteint son maximum, 0cmc.1 du sérum protege la souris contre 750 D.M.L. de toxine. Chez les cobayes la courbe antitoxique continue à baisser lentement.

TABLEAU XXII

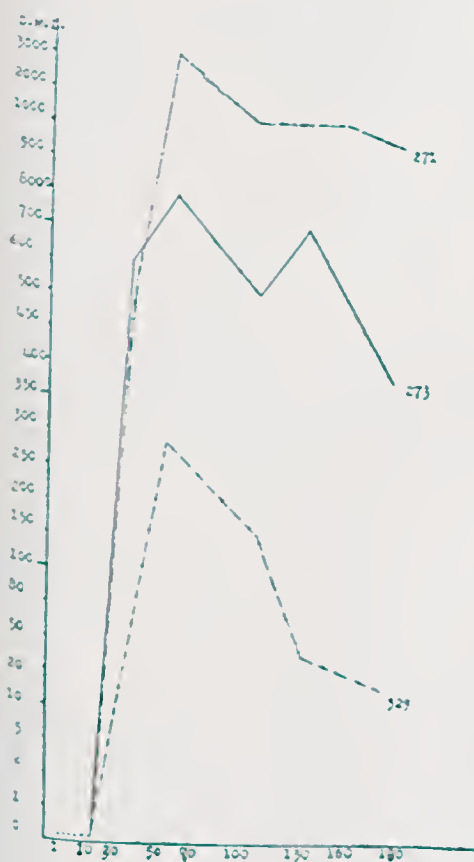
Résultat des dosages cent quatre-vingts jours après l'injection de 70 unités floculantes d'anatoxine tétanique

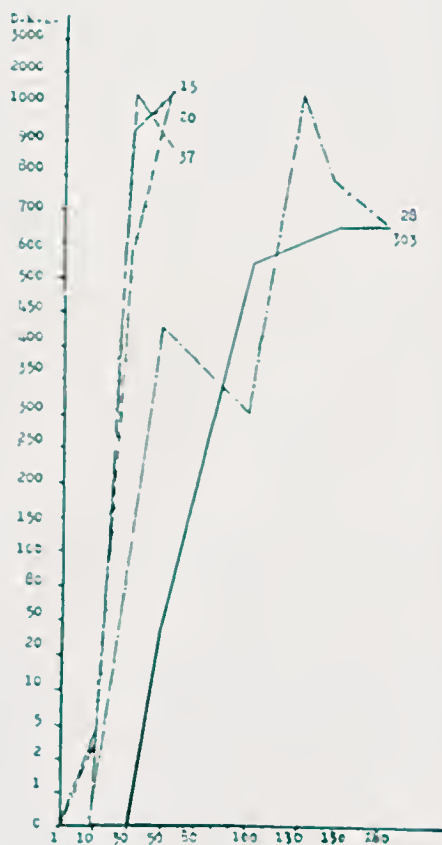
N.º de l'animal	*Date de l'épreuve*	*Toxine*		*Souris*	
		en Mgms.	*en D.M.L.*	*Poids*	*Résultat*
P. 28	16.II.38	1,75	700 D.M.L.	30	M. 24 hs.
	16.II.38	2,00	400 D.M.L.	30	S.
P. 303	16.II.38	2,50	500 D.M.L.	30	S.
	16.II.38	3,00	700 D.M.L.	30	S.
	16.II.38	3,50	700 D.M.L.	30	S.
C. 271	16.II.38	4,00	800 D.M.L.	30	S.
	16.II.38	5,00	1.000 D.M.L.	30	S.
	16.II.38	2,00	700 D.M.L.	30	M. 24 hs.
C. 273	16.II.38	2,50	400 D.M.L.	30	M. 24 hs.
	16.II.38	3,00	500 D.M.L.	30	M. 24 hs.
C. 329	16.II.38	0,05	10 D.M.L.	30	S.
	16.II.38	0,25	50 D.M.L.	30	M. 42 hs.

Saignée faite cent quatre-vints jours après l'injection de 70 unités floculantes d'anatoxine. Chez les preás le titre antitoxine baisse lentement.

RAPPORT ENTRE L'ANTITOXINE CIRCULANTE ET L'IMMUNITÉ DE L'ANIMAL

Dans le but d'établir s'il y avait quelque rapport entre l'antitoxine circulante et l'immunité de l'animal obtenue par l'immunisation active au moyen de l'injection de 70 unités floculantes d'anatoxine tétanique, le second lot de preás et cobayes fut éprouvé avec 100 D.M.L. de toxine tétanique (D.M.L. pour un cobaye de 350 grammes: 1/30.000); quatre cobayes et trois preás éprouvés avec 1 D.M.L. servirent comme témoins.

Graf. III

Courbe d'immunisation des cobayes ayant reçu 70 unités floculantes d'anatoxine tétanique.

Graf. IV

Courbe d'immunisation des preás ayant reçu 70 unités floculantes d'anatoxine tétanique.

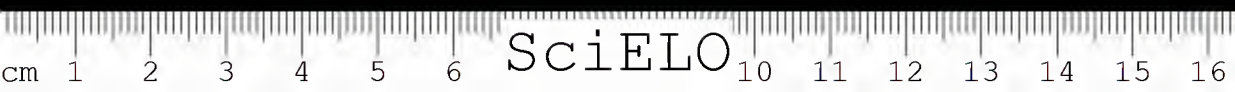



TABLEAU XXIII

Dose totale d'anatoxine en unités floculantes	*Date de l'épreuve*	*Nom de l'animal*	*Dose de toxine en D.M.L.*	*Résultat*	*Obervation*
70	4.11.38	Préa 28	100	S.	Immunis.
70	4.11.38	" 303	100	S.	"
70	4.11.38	Cob. 271	100	S.	"
70	4.11.38	" 273	100	S.	"
70	4.11.38	" 329	100	S.	"
Témoin	4.11.38	Cob. 469	1	M. 84 hs.	Normal
"	4.11.38	" 470	1	M. 84 hs.	"
"	4.11.38	" 471	1	M. 84 hs.	"
"	4.11.38	" 468	1	M. 96 hs.	"
"	4.11.38	Préa 43	1	S.	"
"	4.11.38	" 267	1	S.	"
"	4.11.38	" 287	1	M. 132 hs.	"

On peut constater que les animaux activement immunisés (cobayes et préas) présenterent une remarquable résistance à la toxine tétanique; ils résisterent a plus de 100 D.M.L., tandis que les cobayes témoins ne résisterent pas même à 1 D.M.L. de toxine. Il y a donc un parallélisme certain entre la quantité d'anatoxine circulante et la résistance de l'animal.

COMPORTEMENT DIFFÉRENT DES COBAYES ET DES PREAS VIS-A-VIS DE LA TOXINE TÉTANIQUE

Le tableau XXIII montre que les preás sont beaucoup plus résistante, ou mieux, moins sensibles à la toxine tétanique que les cobayes: tandis que chez les cobayes la mortalité fut de 100 p. 100, chez les préas elle ne dépassa pas 33 p. 100. Le preá qui ne résista pas ne mourut que cent-trente-deux heures après l'injection de toxine, c'est-à-dire beaucoup plus que les cobayes, chez lesquels la mort survint en moyenne quatre-vingt-sept heures après l'épreuve. Les préas présentent donc une résistance plus grande que les cobayes à la toxine tétanique.

DIFFÉRENCE DE COMPORTEMENT DES PREAS ET DES COBAYES, LORS DU TITRAGE DE L'ANTITOXINE TÉTANIQUE

Dans la pratique, cette plus grande résistance des préas ou de leurs descendants peut entrainer des erreurs considérables lorsqu'ils sont utilisés pour le dosage de l'antitoxine tétanique. Etant plus résistants, les petites quantités de

toxine résiduelle non neutralisées seront insuffisantes pour les tuer, alors qu'ils devraient mourir si leur résistance était moins grande. Donc, les titrages faits avec des preás donnent des résultats au-dessus de la réalité. Ces difficultés deviennent encore plus grandes quand on emploie des hybrides pour fixer la dose L + (dose limite mortelle) d'une toxine, comme il apparait à l'examen des tableux ci-dessus.

TABLEAU XXIV

Toxine	Sérum	Diluition du sérum	Cobaye	Poids	RÉSULTAT				
					22|3	23|3	24|3	25|3	Obs.
0.00058	S| Etalon	1|50	126	290	S. S.	S. S.	S. L.	S. L.	S.
9.00060	"	1|50	129	300	S. S.	S. S.	S. L.	S. gr.	S.
0.00062	"	1|50	130	300	S. S.	S. S.	S. S.	S. L.	S.
0.00064	"	1|50	133	300	S. S.	S. S.	S. L.	S. L.	M. 28|3|38
0.00066	"	1|50	124	320	S. S.	S. L.	S. gr	S. gr.	M. 26|3|38
0.90068	"	1|50	120	320	S. S.	S. S.	M. 24|3		
0.00070	"	1|50	131	320	S. S.	S. S.	S. gr	S. L.	M. 25|26|3
0.00975	"	1|50	116	320	S. S.	S. S.	S. gr	M 8 hs	25|3
0.00080	"	1|50	125	330	S. S.	S. S.	S. gr	S. gr.	S.

S. S. = sans symptômes.
S. L. = symptômes légers.
S. gr. = symptômes graves.
M. = mort.
S. = survie.

Note: — Le cobaye n. 125 avait les couleurs d'un véritable preá, mais les sutures naso-frontales étaient du type intermédiaire entre cobaye et preá, témoignant du caractere métis de l'animal; dosage erroné.

Un lot parallèle de cobayes extérieurement purs donna le résultat suivant:

TABLEAU XXV

Toxine	Sérum	Dilution du sérum	Cobaye	Poids	RÉSULTAT				
					22:3	23|3	24|3	24|3	Obs.
0.00058	S/Etalon	1|50	117	290	s. s.	s. s.	s. s.	s. l.	S.
0.00060	»	»	128	300	s. s.	s. s.	s. s.	s. gr.	S.
0.00062	»	»	119	300	s. s.	s. s.	s. l.	s. gr.	M. 30,3
0.00064	»	»	123	310	s. l.	s. m.	s. m.	s. gr.	M. [illegible]
0.00066	»	»	115	310	s. l.	s. m.	s. m.	M. 16hs 25,3	
0.00068	»	»	122	320	2. s.	s. l.	s. gr.	M 16hs 25,3	
0.00070	«	»	127	320	s. l.	s. l.	s. gr.	M. 24-25|3	
0.00075	»	»	132	320	s. l.	s. m.	s. gr.	M. 24-25|3	
0.00080	»	»	131	330	s. l.	s. m.	s. gr.	M. 24-25|3	

Lorsqu'on emploie des hybrides et des doses fort différentes de toxine, lors de la détermination de la dose L +, on court le risque de prendre pour L + une dose de toxine qui sera beaucoup trop élevée pour les titrages postérieurs de sérums, surtout si à ce moment on emploie seulement des cobayes (et non des hybrides). Si pour la détermination de la dose L + on emploie au début des cobayes purs, il est à craindre que la dose déterminée ne soit trop faible pour les titrages à effectuar plus tard si on emploie alors des hybrides.

DISCUSSION

La méthode de dosage utilisée au cours de ces expériences nous a toujours fourni des résultats comparables. Ce procédé a été adopté par Ten Broeck et Bauer (28-31), Coleman et Meyer (5), Zia, Kha et Lech (38), Mikhailova et Welikanov (21). Ces derniers auteurs l'ont employé pour évaluer le taux antitoxique du sérum d'individus immunisés activement au moyen de l'anatoxine tétanique. Nous avons entrepris des expériences, suivant la technique d'Adamson (1) et Gilles (10-a) et de Spray (27), dans le but de constater si les préas sont des porteurs etdeséliminateurs du Cl. tetani.

Dans une première série d'éxpériences nous avons cherché a établir si une stimulation faible avec 28 unités floculantes injectées en deux fois suffirait pour immuniser les préas. Nous constatâmes que chez les cobayes la courbe antitoxique du sérum atteignait son maximum entre cent cet cent trente jours, 0cmc. 1 de ce sérum protégeant la souris contre un maximum de 800 D.L.M. de toxine tétanique. Chez les préas, le maximum fut atteint cent trente jours après la deuxieme injection, le sérum protégeant la souris contre un maximum de 600 D.M.L.. Dans cette premièrc séries les cobayes s'immunisèrent un peu plus rapidement que les préas; toutefois la capacité d'immunisation fut plus uniforme chez ces derniers. La non-immunisation d'un des préas, le n.° 232, nous indique que ces études doivent être reprises sur un plus grand nombre d'animaux.

Si, d'une part, les préas s'immunisent plus lentement et avec moins d'intensité, ils conservent, d'autre part, un titre antitoxique plus haut et plus durable.

Dans une seconde série d'expériences les animaux immunisés avec 70 unités floculantes d'anatoxine tétanique donnerent des résultats différents de ceux obtenus dans la première série. Chez les cobayes la courbe antitoxique du sérum atteignit son maximum cinquante jours après l'injection de l'antigène. Le sérum d'un des cobayes, à la dose de 0cmc. 1, suffit pour protéger la souris contre 3.000 D.M.L. de toxine. Un des préas atteignit son immunité maximum trente jours après l'injection de l'antigène; son sérum protégeait la souris contre 1.200 D.M.L. de toxine. Chez deux autres préas le titre antitoxique du sérum atteignit son maximum respectivem.nt après cent-trente et cent-cinquante jours; 0cmc. 1 du

sérum protégeant les souris respectivement contre 1.200 et 650 D.M.L. de toxine. Ainsi, chez le premier comme chez le second lot, la courbe antitoxique commença à s'abaisser après avoir atteint le maximum; la chute était déjà assez marquée deux cents jours après l'injection de l'antigène; elle était plus accentué chez les animaux qui avaient reçu la plus faible stimulation antigénique.

Il existe donc un rapport direct entre la dose d'anatoxine injectée et la quantité d'anticorps circulants, comme l'avaient déjà remarqué Larsen et Schmidt (19).

Les animaux immunisés activement montrent une remarquable résistance contre plus de 100 D.M.L. de toxine, tandis que les non-immunisés succombent à l'injection de 1 D.M.L. de la même toxine.

Pour ce qui est de la résistance des animaux vis-à-vis de la toxine tétanique, on peut constater que 67 p. 100 des préas résistent à cette toxine, tandis que 100 p. 100 des cobayes lui sónt sensibles. Les différences remarquées entre cobayes et préas sont si nettes qu'il serait préjudiciable d'employer dans un service sérologique indistinctement des préas ou des cobayes. Dans la première génération entre cobayes et préas, il existe une imunité intermédiaire. Cependant ces animaux de la première génération peuvent être éliminés sans peine, car ils présentent l'aspect de préas, c'est-à-dire la couleur cotia. Plus dangereux sont les animaux des génération suivantes, chez lesquels les différentes qualités provenant des cobayes et des préas se détachent, donnant, par exemple, un animal couleur cobaye avec immunité préa, ou encore couleur cotia avec immunité cobaye.

Nous avons fait l'examen d'n caractère morphologique qui diffère chez les cobayes et chez les préas: les sutures naso-frontales et fronto-pariétables, suivant les indicationes de Detlefsem (24). On peut voir sur les tableux II-IV qu'un certain nombre de cobayes présentent des sutures intermédiaires, ce qui signifie, sans doute, qu'ils sont des descendants du croisement cobaye-préa. Ces animaux sont les suivants:

N.° 262 de l'Instituto Butantan: couleur blanche, pelage frisé.

N.° 295 de l'Instituto Butantan: couleur blanche, pelage frisé.

N.° 471 de l'Instituto Butantan: couleur blanche-jaune-noire, pelage lisse.

N.° 271 de la Faculté de Médicine: couleur blanche-jaune, pelage lisse.

Ce dernier animal avait une suture naso-frontale semblable à celle du préa, tandis que la suture fronto-pariétale était identique à celle d'un cobaye (voir fig. 4).

Outre ces cobayes, qui étaient assurément des descendants du croisement entre les deux espèces, nous avons également examiné un animal (n.° 468, tableau XXIII) qui, à côté des couleurs blanche-jaune-cotia trahissant son origine métisse, montra une sensibilité plus faible, certainement héritée des préas.

On trouve dans une même génération. en dehors des caractères morphologiques, une grande différence dans la capacité d'immunisation; si l'on compare, par exemple, la courbe antitoxine obtenue chez les trois frères nos. 311, 312 et 313, on constate que si ce dernier s'imunisa facilement, les deux autres se montrèrent plus réfractaires que tous les autres cobayes. En présence de ces résultats il devint évident qu'il y avait eu dans l'ascendance de ces trois frères un croisement des espèces porcellus et rufescens.

S'il est bien vrai que les métis masculins semblent être tous stériles, suivant la constation de Detlefsen, que nous pouvons confirmer, les femelles, par contre, sont d'une fertiiité extraordinaire.

Les trois premières femelles métisses de notre élevage (Préa ♀ × Cobaye ♂) eurent les nichées suivantes:

No. 2 M née 15.XI.36		No. 280 née 15.II.37		No. 281 née 15.II.37	
24.IV.37	1 petit	23.VIII.37	1 petit	25.IX.37	2 petits
19.VII.37	1 "	27.X.37	2 "	30.XI.37	2 "
21.IX.37	4 "	30.XII.37	1 "	3.II.38	4 "
26.XI.37	2 "				
1.II.38	3 "				

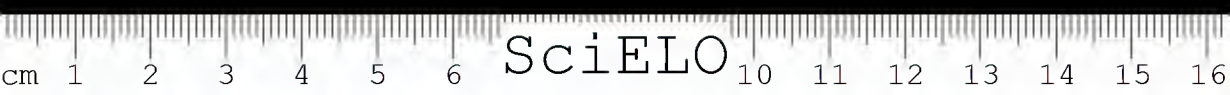
Il faut donc employer les services sérologiques des cobayes provenant d'une race pure et qui s'immunisent uniformément. L'élevage de races pures présentant peu de variations dans leurs aptitudes sérologiques est beaucoup plus facile, rapide et efficace que la méthode employée par la plupart des immunologues et basée sur sélection parmi les individus d'une population.

CONCLUSIONS

1 — La généralité des préas ne possèdent pas dans leur sérum d'antitoxine d'origine naturelle, ce qui est aussi le cas de tous les cobayes examinés.

2 — Les cobayes sont plus sensibles à la toxine tétanique que les préas, qui sont nettement plus résistants.

3 — Contrairement à ce qui a été remarqué avec l'anatoxine diphtérique, l'anatoxine tétanique semble immuniser la plupart des preás aussi bien que les cobayes, quoique la courbe d'immunisation soit différente.

4 — Le degré d'immunité dépend de la quantité dantigène injecté à chaque animal, tout au moins dans une certaine limite.

5 — Lorsqu'on emploie des individus hybrides de cobaye et preá, les différences dans la sensibilité de l'une et de l'autre espèce à la toxine tétanique deviennent bien nettes et peuvent même entrainer d'importantes erreurs dans la détermination de la D.M.L. des toxines, étant donné qu'il faut un nombre considérable d'animaux pour chaque épreuve. Ces erreurs se produisent encore lorsqu'on emploie de tels hybrides pour le dosage des antitoxines.

6 — Il faut sélectionner des races de cobayes pures, de telle sorte que ces animaux atteignent le poids étalon de 350 grammes à un âge qui ne varie que légèrement.

BIBLIOGRAPHIE

1. — *Adamson, R. S.* — On the cultivation and isolation of Bacillus tetani — Journ. Pathol. and Bact. XXIII, 241,1919-20.
2. — *Bradford, Hill A.* — The inheritance of resistance to bacterial infection in animal species — Special Report Series N.º 196. His Majesty's St. Off. 1934.
3. — — System of Bacteriology VI:108.1931.
4. — *Cole, L. J.* — Inheritance of disease resistance in animals — Amer. Nat. 64:5.1930.
5. — *Coleman, G. E. & Meyer, K. F.* — Characteristics of new strain of Cl. tetani — Journ. Inf. Dis. 39:328.1926.
6. — *Coleman, G. E.* — Intestnal carriers of C. tetani and immunity. Tetanus IX — Amer. Journ. Hyg. XIV(3):515,1931.
7. — *Detlefsen, J. A.* — Genetic studies on a Cavy Species Cross — Washington. Publ. Carnegie Institution of Washington I:132.1934.
8. — *Dreyfus-See, G.* et *Lesné, E.* — Selection d'espèces à caractères immunitaires fixes. Transmission de ces caractères selon les lois mendiliennes et modifications durables obtenus par les vaccinations repétés — C. R. Soc. Biol. XCVIII:922.1938.
9. — *Ehrlich, P.* — Ueber Immunitaet durch Vererbung und Saeugung — Hyg. Infekt. XII:183.1892.
10.a— *Gilles, E. C.* — A satisfactory method of isolating tetanus organisms from fixed material — Amer. Journ. Hyg. XXV(2):394.1937.
10.b— *Gilles, E. C.* — A study of the biochemical reactions of strains of Cl. tetani isolated from street dust — Amer. Journ. Hyg. XXVI(2):401.1937.
11. — *Glenny, A. T.* et *Suedmersen, H. J.* — Journ. Hyg. IX:3933.1909.
12. — *Grasset, E.* — A comparative study of the aptitude of the higher animal organism to acquire immunity throughout the vital cycle and the relation of this aptitude to hereditary transmission. — South African Inst. Med. Res. IV(24):17.1929.
13. — *Herwich, R. P., Weir, E. F.* et *Tatum, A. L.* — Seasonal variation in Susceptibility of Animals to Tetanus Toxin — Proc. Soc. Exper. Med. XXXV:256.1936.
14. — *Irwin, M. R.* — Inheritance as a factor in resistance to and infections disease. I. The uniform reaction of inbred strain of animals. — Journ. Immun. XXIV:285.1933.
15. — *Irwin, M. R.* — II. Differential Host Reactions and the Effects of Selection within a Population — Journ. Immun. XXIV:297.1933.
16. — *Irwin, M. R.* — IV. The correlatiaons between resistance of the host and certain measured variables — Journ Immun. XXIV:330.1933.
17. — *Lambert, W. V.* — Natural resistance to disease in chicken. I. The effect of selective breeding on natural resistance to fowl typhoid — Journ. Immun. XXIII:229.1932.

18. — *Lambert, W. V.* — The evidence for inheritance of resistance to Bacterial disease in animals — Quarterley Rev. Biol. VIII:33.1933.

19. — *Larsen, A. S. et Schmidt, S.* — Immunisation active contre le tetanos au moyen de l'anatoxine de G. Ramon — Acta Pathol. et Microbiol. Scand. XIII(1):61,1935.

20. — *Lemétayer, E.* — Relation entre la pigmentation de la peaus et résistance à l'intoxication tétanique chez le cobaye — C. R. Soc. Biol. CXII:354.1933.

21. — *Mikhailowa, Z. et Welikanov, I.* — L'immunisation active de l'homme contre le tetanos — Rev. D'Imm. II(1):263.1936.

22. — *Nicolle* et *Ramon* — Cités par Lemétayer C. R. Soc. iBol. CXII:354.1933.

23. — *Perrin, M.* et *Alain Cuénot* — Sur la résistance à la toxine tétanique du cobaye albino — C. R. Soc. Biol. CVI:199.1931.

24. — *Rosenau, M. J. et Anderson, J. F.* — The standardization of tetanus antitoxin — Hyg. Lab. Bull. XLIII(March):6.1908.

25. — *Schott, R. G.* — The inheritance of resistance to Salmonella aertryke in various strain of mice — Genetics XVII:203.1932.

26. — *Smith, T.* — Degrees of susceptibility to diphtheria toxin among guineapigs. Transmission from parents to offspring — Journ. Med. Res. XIII:341.1905.

27. — *Spary, R. S.* — Semisolid media for cultivation and identification of the sporulating anaerobes — Journ. Bact. XXXII(2):135.1936.

28. — *Ten Broeck, C.* et *Bauer, J.* — The tetanus bacillus as an intestinal saprophyte in man — Journ. Exp. Med. XXXVI:261.1922.

29. — *Ten Broeck, C.* et *Bauer, J.* — Studies on the relation of tetanus bacilli in the digestive tract to tetanus antitoxin in the blood — Journ. Exp. Med. XXXVII:473.1923.

30. — *Ten Broeck, C.* et *Bouer, J.* — The immunity produced by the growth of tetanus bacilli in the digestive tract — Journ. Med. XLIV:361.1926.

31. — *Ten Broeck, C.* et *Bouer, J.* — Tetanus carriers in experimental animals — Proc. Soc. Exp. Biol. Med. XXI:267.1923-24.

32. — *Topley, W. W. C.; Wilson, J. et Lewis, E. R.* — Journ. Hyg. XXIII:425.1925.

33. — *Ubisch, G. von* et *Amaral, J. Planet do* — Differença da capacidade de immunisação da cobaia (*Cavia porcellus L.*) e do preá (*Cavia rufescens Lund*) contra a anatoxina diphterica. — Mem. Inst. Butantan X:179.1935-1936.

34. — *Ubsch, G. von* et *Amarol, J. Planet do* — Unterschied der zahmen und wilden Meerschweinchen (Cavia porcellus Lund — Cavia rufescens Lund) bezueglich ihrer Immunisierbarkeit durch Diphtherie-anatoxin — Genetica XX:51-58 Haag. 1938.

35. — *Webster, L. T.* — Microbic virulence and host susceptibility in paratyphoidenteritidis infection of white mice. IV. The effect of selective breeding on host resistance — Journ. Exp. Med. XXXIX:879.1924.

36. — *Wilson, G. S.* — Transient fluctuations in the resistance of mice to infection white B. aertrycke — Journ. Hyg. XXX:196.1930.

37. — *Wrght, S.* et *Lewis, P. A.* — Factor in the resistance of the guineapig to tuberculosis with specal regard to inbreeding and heredity — Amer. Nat. LV:20.1921.

38. — *Zia, H. H.; Kha-Tim Lim* et *Leoch, C. N.* — La teneuer en antitoxine du sang de la mère et du nouveau-né après injecton d'anatoxine tetanique de Ramon aux mères enceintes — Rev. D'Immonul. II(3):260.1936.

(Por gentileza do Prof. G. Ramon, do Instituto Pasteur de Paris, foi o presente trabalho publicado, em francês, na "Revue d'Immunologie" 5(1):54.1939. Publicado posteriormente no "Brasil-Medico" 53(1. 23.1939).

PREPARACIÓN DEL SUERO ANTIGANGRENOSO

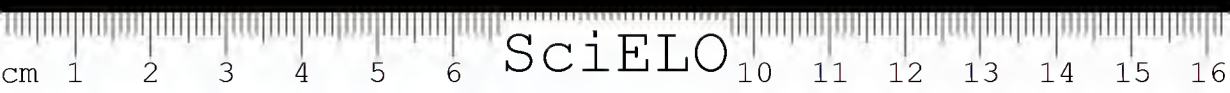
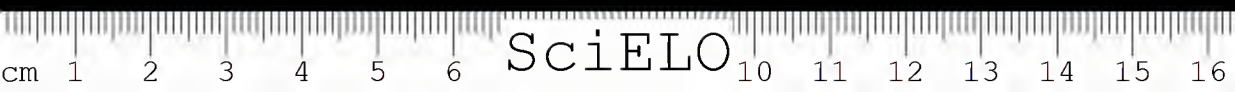
POR

ARIOSTO BÜLLER SOUTO

Jefe de la Sección de Anaerobios del Instituto Butantan (Brasil).

Y

JUAN B. RIVAROLA

Jefe del Laboratorio de Seroterapia de la Sanidad Militar (Paraguay).

NOTA

El presente trabajo, siendo en parte el resultado de algunos años dedicados al estudio de los gérmenes anaerobios, fué enviado simultaneamente a la "Revista de Sanidad Militar", órgano oficial del Departamento de Sanidad del Ejercito Paraguayo. La dirección de la citada Revista, dedicó a esa publicación cuatro números especiales precediéndola de las siguientes y generosas expresiones:

> "La Dirección de la Revista de Sanidad Militar, se honra en publicar en el presente número, como una deferencia especial del Instituto Butantan a la Sanidad Militar, el original trabajo sobre la técnica empleada actualmente para la preparación del suero antigangrenoso.
>
> Siendo la gangrena gaseosa, un problema casi exclusivamente militar que amenaza al herido de guerra, y teniendo en cuenta el honor especial dispensado al Sr. Juan B. Rivarola, bacteriólogo militar enviado por la Dirección Superior de Sanidad Militar y el Ministerio de Salud Pública para realizar estudios sobre inmunoterapia y organización de algunas instituciones científicas del Brasil, consideramos la presente colaboración científica, como un alto honor dispensado a la Revista de Sanidad Militar de nuestro país.
>
> Sirvan pues estas líneas, como un cordial homenaje de agradecimiento de la Revista de Sanidad Militar, a la Dirección del Instituto Butantan de San Pablo, que ha contribuído así a afianzar la tradicional amistad entre los dos países y a iniciar el intercambio intelectual de sus hombres de ciencia".

615.37:616.245

PREPARACIÓN DEL SUERO ANTIGANGRENOSO

I. Preparación del suero antiperfringens

POR

ARIOSTO BÜLLER SOUTO y JUAN B. RIVAROLA

Jefe de la Sección de Anaerobios del Instituto Butantan (Brasil)

Jefe del Laboratorio de Seroterapia de la Sanidad Militar (Paraguay)

INTRODUCCIÓN

La capacidad del *Cl. perfringens* de producir exotoxina genuina termolábil, fue señalada por primera vez en 1917 por Bull y Pritchett (6) haciendo crecer este anaerobio, de 18 a 24 horas, en caldo glucosado a 1 %, con fragmentos de músculos; 0,1 a 0,01 c.c. de este caldo toxina filtrado e inoculado en palomas acarreaba la muerte de ésta.

Estos trabajos fueron confirmados por De Kruiff, Adams e Ireland (10). En 1919, el British Medical Research Committee (25), establecía, que el Cl. perfringens requería medios ácidos para la producción de toxina, que la presencia de pequeños trozos de músculo favorecía la producción, y que pasajes preliminares de las muestras en palomas, aumentaban su poder toxigénico. La toxina así obtenida era termolábil, no dializable y muy susceptible a la acción de los ácidos, siendo capaz de producir hemolisis *in-vitro* e *in-vivo*, necrosis, edema y estimulación de los músculos involuntarios, poseyendo por otra parte propiedades antigénicas.

La toxina de *Cl. perfringens*, primitivamente era de muy difícil obtención; Weinberg y Seguin (55) señalaban en 1919, que Hitschmann, Lindenthal, Kamen, Jungano y Distaso, Tissier, jamás consiguieron prepararla; al paso que, Pastini, Metchnikoff, Korentchewsky y Melikoff sólo consiguieron bastante débil. Con toxinas que mataban los cobayos a dosis de 2 c.c. por vía venosa, Klose (21) consiguió un suero polivalente francamente antitóxico conocido como "Gasoedemmischserum K. W. A.".

En 1920 Weinberg y Nasta (51) mostraron que la toxina de Cl. perfringens debía su poder tóxico tanto a su hemolisina, como a un componente no hemolítico. Una toxina privada de su hemolisina puede aun matar un cobayo pequeño. usando dosis dobles o triples de la toxina con hemolisina.

Henry y Lacey (17) en 1920, mostraron la possibilidad de obtener una toxina seca de la manera siguiente: la toxina es filtrada y precipitada en 2/3 de sulfato de amonio. El precipitado es comprimido y secado al vacio sulfurico, siendo pulverizado en seguida. El polvo obtenido es redisuelto en solución salina o en agua destilada y precipitado nuevamente en 2 volúmenes de alcohol: 1 c.c. de esta toxina contiene 50 a 250 D. M. L. para la laucha. Por este processo se obtiene 40 a 60% de actividad de la toxina bruta. Henry (16) verificó todavia. que la hemotoxina puede ser precipitada por el sufato de amonio y que el *Cl. perfringens* aparte de su hemotoxina produce otra toxina que él designó como miotoxina. La hemotoxina sería más estable que la tetanolisina, conservándose por largos períodos a baja temperatura. En cuanto a la miotoxina es destruída en estas condiciones.

Fuera de esta toxina verdadera, Von Wassermann (37) demostró que el *Cl. perfringens*, en ciertos medios conteniendo glucosa, forma un veneno no especifico, capaz de matar instantaneamente la laucha por via venosa. Esta observación fue confirmada por Kojima (22) que demostró, que además de la toxina genuina termolabil, neutralizable por el suero específico, no dializable, que mata los animales en algunas horas, se produce en los medios ricos en glucosa, un veneno agudo termostable, dializable, no neutralizable por el suero y que acarrea la muerte instantánea de los animales inoculados.

Kendall à Schmitt (18) pudieron concluir que este veneno agudo tiene una constitucion semejante a la histamina, causando la contracción del intestino delgado y del útero aislados del cobayo, siendo inactivado por la adición de 0.1 % de formol neutro.

Wuth (58) estudió la hemolisina del liquido del edema de los cobayos inyectados y de los medios de cultura, hallando que era termolabil, destruible cuando es expuesta al aire y neutralizable solamente por el suero anti-perfringens

La reacción del liquido en que se hace la suspensión de los glóbulos rojos ejerce influencia en el dosaje de esta hemolisina, la cual es destruída en liquidos de reacción muy alcalina. Del mismo modo, puede admitirse que la reacción sanguinea, siendo alcalina, impide en cierto modo *in-vivo* la acción hemolitica de la hemolosina del *Cl. perfringens*.

Mason y Glenny (24) mostraron que se puede dosar un suero perfringens por su poder antihemolitico *in-vitro*. Los resultados obtenidos son idénticos a aquellos de la dosificación *in-vivo* y obtenida por la mezela toxina-antitoxina inoculada en lauchas por via intravenosa.

Al lado de los componentes hemotóxicos de las toxinas, Weinberg, Nativelle y Prevot (52 admiten la existencia en las toxinas, de otros componentes no hemotóxicos, según puede verse en el esquema siguiente:

a)	Toxinas hemotóxicas o hemotoxinas	Hemolisinas. Hemoaglutininas. Leucoaglutininas.
b)	Toxinas no hemotóxicas	Neurotoxina. Miotoxina. Hepatotoxina.

Aparte de las toxinas neutralizadas por el suero preparado con cepas de *Cl. perfringens* tipo Welch, describieron los bacteriólogos ingleses, otros tipos de *Cl. perfringens*: Bacilo agni (Lamb Dysentery bacillus) descripto por Dalling (8), el B. paludis de Mc Ewen (23), el Bacilo D de Wilsdon y el Bacilo ovitoxicus de Bennetts (2) cuyos componentes antigénicos no serían generalmente neutralizados por el suero antiperfringens obtenido por immunización, con toxina de *Cl. perfringens* tipo Welch.

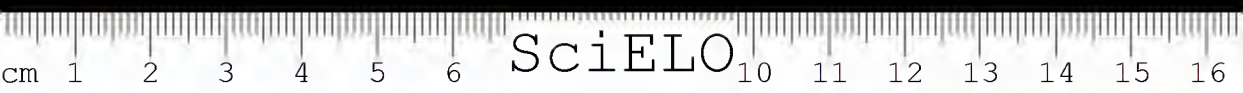
La descripción de estos tipos con antígenos propios, imprimió nueva orientación a los estudios sobre los antigenos y los sueros de este anaerobio.

Ya anteriormente, había sido admitida la existencia de tipos diversos de *Cl. perfringens*, basándose su individualización en criterios dispares.

Simmonds en 1915 (33) basándose en la fermentación de la glicerina y la inulina, estableció una clasificación en 4 tipos. Esta clasificación fue abandonada después de Humphreys (19) que demostró que la fermentación de la glicerina por el *Cl. perfringens* produce la acroleina que es tóxica para el mismo.

Basándose en pruebas de neutralización de la toxina por los sueros preparados en conejos y carneros, Wilsdon (56) propuso una nueva clasificación.

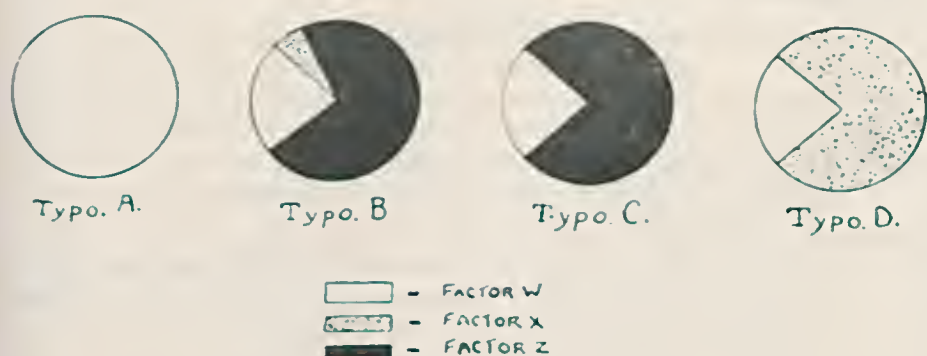
En esta clasificación la toxina del *Cl. perfringens* tipo humano (tipo Welch) es designada por la letra A; la toxina de la diarrea del cordero (L D bacillus. B. agni) por la letra B; la toxina del *Bacillus paludis* por la letra C; y por la letra D, la toxina de una cepa especial aislada por él.

Los resultados de estas experiencias están esquematizadas en el cuadro siguiente:

Tipo	*Toxina*	*Antitoxina*
A) —	Producción máxima después de 18 a 24 horas de incubación. Fuertemente hemolitica. Inestable a la temperatura ambiente. Mata lentamente. D. M. L. (para laucha) 0,1 e 0,5.	Neutraliza solamente toxina de tipo A.
B) —	Producción máxima después de 15 a 24 horas de incubación. Inestable a la temperatura ambiente. Termolabil. Mata ràpidamente. D. M. L. (para laucha) (0,01 a 0.0001.	Neutraliza las toxinas de los tipos A, B, C. y D.
C) —	Producción máxima después de 18 a 24 horas de incubación. Estable a la temperatura ambiente. Termolabil. Mata ràpidamente. D. M. L. (para laucha) 0,0005 c. c.	Neutraliza las toxinas de los tipos A, B y C.
D) —	Producción máxima después de 3 dias de incubación. Estable a la temperatura ambiente. Hemolitica. Termoestable. Mata lentamente. D. M. L. (para laucha) 0,1 a 0,0025.	Neutraliza las toxinas de los tipos A y D.

Estos resultados muestran claramente las diferencias de estructura antigénica de los 4 tipos. El tipo A, es evidentemente el tipo más simple, pues su antitoxina es incapaz de neutralizar las toxinas B, C y D.

Wilsdon (56) propone el signo W para representar el factor o los factores antigénicos presentes en A. — W está presente por tanto, en los tipos B, C y D, pues sus antitoxinas son capaces de neutralizar la toxina A. Juntamente con W existe en B otro componente designado con la letra Z, siendo antitoxina C capaz de neutralizar la toxina B (tal como es preparada ordinariamente); este factor Z está también presente en el tipo C, siendo él, sin duda, la causa de la muerte rápida de los animales inoculados con las toxinas B y C. Este factor Z está probablemente presente en mayor proporción en C, que en B, porque la cantidad correspondiente de antitoxina de cada tipo, necesaria para neutralizar una cantidad de C, es prácticamente dos veces la requerida para una cantidad equivalente de toxina B. Pero esta diferencia sólo difícilmente justificaria la colocación de B y C en grupos separados.

Después de los estudios de Wilsdon (57) sobre el otro tipo de *Cl. perfringens* denominado tipo D, esta separación de los tipos B y C tornóse necesaria. En efecto, la toxina del tipo D es neutralizada por antitoxina B, no siendo por la antitoxina C; existe por tanto un componente antigénico que fue denominado por el signo X, común a las toxinas B y D, no existiendo en la toxina C. Las toxinas B y C no son por tanto antigénicamente idénticas. El tipo D no contiene factor Z porque su antisuero no neutraliza las toxinas B o C.

Esquemáticamente Wilsdon representa en la siguiente forma estos 4 tipos:

Numerosas pruebas mostraron que la antitoxina C no contiene el factor X, y dando antitoxina C, por otro lado, fuerte protección contra B, puede concluirse que el factor X, existe en muy pequeña cantidad en la toxina B, obtenida con 18 horas de incubación.

Siendo el factor X el componente más importante de la toxina D, cuyo tenor tóxico máximo es alcanzado después de 3 dias de incubación, Wilsdon (53) procuró verificar si era posible aumentar el tenor del componente X después de un período de crecimiento de tres dias.

Después de incubación por 18 horas a 37° C, de uma cepa tipo B, en caldo de V. F., la D. M. L. era de 0.0025 c.c. Las antitoxinas de los tipos B y C neutralizaban esta toxina, la cual no era neutralizada por la antitoxina tipo D. Al fin de tres dias de incubación fue filtrada dando una D. M. L. de 0.05 c.c., perdiendo así, de manera notable su tenor tóxico en comparación con el dosaje primitivo, y en cuanto a antitoxina B aun daba protección; las antitoxinas C y D. aisladamente no protegían, dando todavía protección efectiva la reunión de las dos, lo que ha venido a evidenciar que la cantidad de factor X presente en la toxina B, varía con el tiempo de incubación. Después de 18 horas de crecimiento es muy pequeño el tenor del factor X presente en la toxina B; después de 3 días esta cantidad ya no es despreciable. Con 18 horas de incubación la toxina B es termolabil, al paso que con 3 dias de incubación la toxina B no es enteramente destruída por el calor. Este aumento de la termoresistencia está de acuerdo con la presencia de cantidades mayores de factor X al cual también se debe la termoestabilidad de la toxina D.

Estudiando comparativamente la toxina de tipo D con la producida por el bacilo aislado por Bennetts en 1932 (2) del intestino del carnero en Australia, denominado Bacillus ovitoxicus — probablemente idéntico al Bacillus ovitoxicus, Var: Nueva Zelandia, aislado por Gill (12) y al Bacillus ovitoxicus, var: Tasmania aislado por Oxer (29), — Wilsdon (57) concluyó por estabelecer la iden-

tidad de la toxina del tipo D con la toxina del tipo Ov conforme se verá en el cuadro seguiente:

Tipo	*Toxina*	*Antitoxina*
B. Ovitoxicus	Producción máxima después de 3 dias de incubación. Hemolitica. Estable a la temperatura ambiente. Termoestable. Mata lentamente. D. M. L. (para lauchas). 0.005. c. c.	Neutraliza las toxinas B ovitoxicus y Cl. Welchi tipos A y D
D.	Producción máxima después de 3 dias de incubación. Hemolitica. Estable a la temperatura ambiente. Termoestable. Mata lentamente D. M. L. (para lauchas) 0.1 a 0.0025.	Neutraliza las toxinas B ovitoxicus y Cl. Welchi tipos A y D

A este notable trabajo, Glenny, Barr, Llewelly-Jones, Dalling y Ross (14) hicieron dos serias objeciones: 1º el poder protector puede preexistir como resultado de uma inmunidad natural, anterior a cualquier immunización; 2º la ausencia de poder protector del suero contra un antígeno dado, no es una prueba suficiente de ausencia de este antigeno en el filtrado inmunizante.

Por otra parte la variación de poder tóxico por vía venosa en lauchas, representa la medición de los varios efectos, no dando indicación suficiente sobre los caracteres individuales de cada toxina separadamente, siendo necesario para esto, usar varios métodos, basados ya sea en el poder hemolitico, ya en le poder necrosante. Consiguieron así los citados autores, demostrar la existencia de cinco toxinas que fueron designadas con las letras Alfa, Beta, Gama, Delta y Epsilon.

Toxina Alfa. — Es la toxina de *Cl. perfringens* clássico (tipo Welch) que es neutralizada cuantitativamente por la antitoxina de la Gangrena gaseosa (perfringens); está también presente en los filtrados de los cultivos L D y Bacillus paludis. La cantidad de toxina Alfa presente en los filtrados de bacilos L D y Bacillus paludis representa cerca de 1/40 de la tasa contenida en un filtrado de *Cl. perfringens* (tipo Welch).

Toxina Beta. — Es una toxina necrótica, no hemolitica: produce reacción purpúrea en el cobayo, usualmente después del segundo dia de inoculación subcutánea. Es neutralizada sólo por los sueros anti L D o anti paludis y en número reducido de casos, por los sueros de algunos animales nuevos. La toxina Beta es la constituyente principal de los filtrados de L D y paludis.

Toxina Gama. — Es encontrada en los filtrados de L D, mortal para las lauchas por vía venosa. No es neutralizada por la antitoxina Beta y Alfa; su presencia sólo puede ser inferida por la observación de la existencia de sueros que

gran poder protector contra las toxinas L D (pruebas intracutáneas en cobayos) y poder protector bajo para las lauchas, mismo en presencia de exceso de antitoxina Alfa. Esta toxina es probablemente producida en pequeñas cantidades por el B. paludis porque antitoxina Gama existe en los sueros de los caballos inmunizados contra toxina paludis.

Toxina Delta. — Es una hemolisina producida por el B. paludis, siendo probable que exista también, en pequeña cantidad en los filtrados de L D, porque los sueros de los caballos inmunizados con los filtrados de L D protegen contra la hemolisina del B. paludis. Sueros con bajo poder protector para las lauchas, en relación a su contenido de antitoxina Beta son también pobres en antitoxina Delta. La toxina Delta es diferentes de la toxina Gama porque el suero de un caballo inmunizado con filtrado de paludis muy activo por vía venosa, contra toxina paludis y conteniendo un exceso de antitoxina Alfa y antihemolisina paludis, muestra tener un título mucho más débil que dosado contra la toxina L D. Otro caballo inmunizado con filtrado L D no produjo ni hemolisina paludis, ni antitoxina Gama. Prosiguiendo la inmunización de este caballo, el suero no demostró jamás la existencia de antihemolisina paludis, tornándose muy activo, tanto por vía venosa por vía subcutánea contra la toxina L D, lo que hace pensar que el suero debería contener anticuerpos Gama.

Toxina Epsilon. — Es producida por el *Cl. perfringens* tipo D de Wilsdon. En ella se encuentra una hemolisina idéntica a la toxina Alfa y una toxina necrótica. La toxina no es neutralizada de una manera notable, ni por la antitoxina Beta, ni por los sueros antitóxicos L D y paludis recientemente preparados. Este elemento necrótico sólo fue neutralizado por un suero L D preparado en caballos inmunizados con toxina obtenida antes del año 1930. Como la muestra que había servido para obtener los sueros antitóxicos de la primera experiencia, era la misma que sirvió para la preparación de la toxina envejecida de la segunda experiencia, piensan los autores, que estas muestras pierden con el tiempo sus propiedades de producir toxina Epsilon o que tal vez, una pequeña modificación en el crecimiento de la muestra D había alterado la capacidad de produción de la toxina Epsilon.

Confirmando los trabajos de Wilsdon, en sus líneas generales, Borthwick (3) con todo, encuentra algunos resultados discordantes. Tales discordancias se refieren particularmente a los sueros anti C y anti D y se basan en lo siguiente: Wilsdon, Glenny y colaboradores (13) establecieron que el suero anti C sería capaz de neutralizar la toxina A (exp.: hechas en lauchas por vía venosa) Borthwick no consiguió demostrar la neutralización de la toxina A por los sueros anti C, mismo usando suero puro (exp. hechas en lauchas por vía venosa). Esta neutralización sólo fue observada usando el cobayo por via subcutánea. Los sueros anti D y anti ovitoxicus preparados por Borthwick en conejos no actúa absolutamente sobre la acción necrosante de la toxina C (exp. en cobayos por vía subcu-

tánea). Una acción protectora débil por los sueros anti D y anti ovitoxicus es ejercida mismo en la dilución de 1/5 sobre la toxina C cuando se usa la laucha por vía venosa, el suero anti D manifiesta esta acción protectora retardando la muerte de los animales de prueba, al paso que el suero anti ovitoxicus protege 66 % de los animales inoculados. De sus experiencias Borthwick pudo concluir, que el suero anti A neutraliza solamente la toxina A, protegiendo la dosis de 1 c.c. contra 0,5 c.c. de las culturas de A y D.

El suero anti B, neutraliza las toxina A, B, C, D y Ov y los cultivos A, B y C. El suero anti C protege 50 % de los cobayos inoculados con cultivos de B y C. El suero D neutraliza solamente cultivos B. Verifícase de estas experiencias que el suero anti A que no neutraliza la toxina D, neutraliza los cultivos D; y que el suero anti B que neutraliza la toxina D, no neutraliza el cultivo D. El suero anti D mucho más activo contra la toxina ovitoxicus que contra la propia toxina D se muestra inexplicablemente inactivo contra los cultivos ovitoxicus.

En trabajos posteriores Borthwick (4) analizando cepas de *Cl. perfringens* provenientes del intestino de cobayos, conejos, perros y del hombre, señaló las irregularidades en la producción de ciertos componentes tóxicos de los diferentes tipos de *Cl. perfringens*. Verificó que el factor X de la toxina tipo B puede no ser producido en cobayos, pudiendo ciertos cultivos del tipo B, perder su capacidad de producir el factor X. Verificó, aun más, que todas las muestras aisladas de cobayo eran del tipo D, y que de las heces humanas y de conejos, solamente pudo aislar, muestras del tipo A. De las heces de perros consiguió aislar muestras de los tipos A y D y pudo constatar que las muestras del tipo D recientemente aisladas de perros, mostraban tendencia a simplificarse pasando para el tipo A. Juntamente con Gray (5) pudo confirmar que todas las muestras de *Cl. perfringens* aisladas del hombre eran invariablemente del tipo A.

Continuando esta serie se investigaciones Weinberg y Guillaumie (42) trajeron nuevos esclarecimientos sobre la constitución antigénica del *Cl. perfringens*. En sus trabajos adoptaron la nomenclatura de Wilsdon para los diversos tipos de *Cl. perfringens*, designando los antígenos correspondientes con las letras *a*, *b*, *c*, *d* y *ov*.

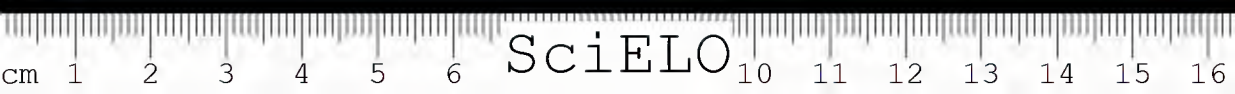
La toxina A, contendría los antígenos *a* y *b* (*b* en muy pequeña cantidad).

La toxina B, los antígenos *b* y *c* en gran cantidad y los antígenos *a*, *d* y *ov* en cantidad débil.

La toxina C los antígenos *b* y *c*.

La toxina D, los antígenos *b* (en pequeña cantidad), *d* y *ov*.

De donde se puede concluir que los cinco antígenos se encuentran en cantidades importantes, pero en proporciones variables en la toxina del tipo B.

En virtud de esta constitución antigénica, verifícase que el suero anti A no ejerce acción antitóxica potente sino sobre la toxina A. El suero anti B neutraliza muy fuertemente las toxinas B y C y ligeramente las toxinas A, D y Ov.

El suero anti C neutraliza débilmente la toxina A y fuertemente las toxinas B y C. Los sueros anti D y anti Ov son capaces de neutralizar además las toxinas homólogas D y Ov y cantidades importantes de toxina A, siendo poco eficaces contra las toxinas D y C.

Así, los sueros anti C, anti D y anti Ov, neutralizan nitidamente la toxina A, en tanto que el suero anti A no neutraliza ni la toxina C, ni la toxina D, ni la toxina Ov. Los sueros anti ovitoxicus neutralizan la toxina C, en tanto que el suero anti C, no neutraliza la toxina Ov.

Para explicar estos hechos podría pensarse que la toxina A contiene cierta cantidad de haptenos, esto es, substancias o agrupaciones antigénicas capaces de fijar la antitoxina D o la antitoxina Ov, y en la toxina C haptenos para la antitoxina Ov. Es probable entonces, que la toxina Ov contenga pequeña cantidad de antígeno *a*. El suero anti A no neutraliza la toxina Ov porque la cantidad de antigeno *a* presente en la toxina Ov es tan pequeña que su neutralización por el suero anti A no llegaría hasta disminuir sensiblemente el efecto tóxico (para la laucha) de la dosis de toxina Ov usada.

Teniendo en cuenta los varios hechos apuntados, Weinberg y Guillaumie (44) dividen las especies perfringens en dos tipos:

Tipo Welch o tipo A

Tipo Ovino	Grupo I	L D B o tipo B
		Bac. paludis o tipo C
	Grupo II	B. D. de Wilsdon o tipo D
		B. ovitoxicus o tipo Ov

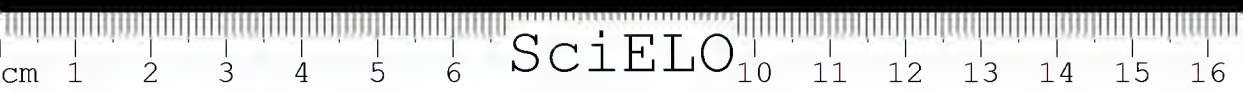
De estos estudios resulta, que para que la reacción toxina-antitoxina tenga valor, es necesario efectuarla con antitoxina muy activa contra todas las toxinas de los diferentes tipos de *Cl. perfringens;* y para reducir al mínimo el número de fracasos de la seroterapia específica es indispensable usar un suero activo contra todos los antigenos tóxicos de una especie microbiana.

Para preparar buenos sueros antiperfringens tipo A, se debe emplear cepas muy activas del tipo A, que sean buenas productoras de los diferentes componentes tóxicos del tipo A: toxina hemolitica, no hemolitica, necrosante, neurotóxica y miotóxica.

Para preparar los holosueros antiperfringens (44), esto es, sueros antiperfringens eficaces contra todos los gérmenes de la especie perfringens, es necesario inmunizar los animales contra todos los antígenos de los diferentes tipos de *Cl. perfringens.*

A—Suero antiperfringens tipo A.

I — Preparación de la toxina

Cepa – No todas las cepas de *Cl. perfringens* tipo A son buenas productoras de toxina. Es pues necesario seleccionar aquellas activamente toxigénicas.

Para la preparación de toxina destinada a la obtención de sueros tipo A se debe emplear las muestras de tipo A, tipo Welch, activas productoras de los diferentes componentes tóxicos, de acción hemolítica, no hemolítica, necrosante, neurotóxica y miotóxica de la toxina de tipo A.

Solamente un número muy pequeño de muestras, es capaz de producir toxinas óptimas. Se puede a veces conseguir aumentar la capacidad toxigénica de una muestra, por inoculación en el músculo pectoral de palomas, que causa la muerte de esta ,generalmente en 8 horas. Retirándose un fragmento de esta masa muscular y emulsionándola, se inyecta a otra nueva paloma, de la que se ha de pasar directamente al medio de cultura.

A veces el poder toxígeno de las muestras caen inexplicablemente, aún tomando todas clases de precauciones. Estas caídas bruscas del poder toxígeno fueron observadas por nosotros y señaladas igualmente por varios autores.

Es necesario repicar las muestras toxigénicas diariamente, antes de efectuar las siembras definitivas en los balones, conteniendo el medio de cultura.

Para la preparación de holosueros de *Cl. perfringens* es necesario poseer muestras de los cinco tipos de *Cl. perfringens* conocidos, esto es: tipo A (tipo Welch), tipo B (L D bacillus B, agni), tipo C (Bacillus paludis), tipo D (Bacillus de Wilsdon) y tipo Ov (Bacillus ovitoxicus).

En el Instituto Butantan poseemos 34 cepas para la preparación de suero antiperfringens tipo A (tipo Welch).

Medios de cultivo.

A. — Medical Research Committee (25) propuso el medio siguiente:

1º — Hervir durante 1 hora, carne de caballo triturado en agua en partes iguales, adicionando cloruro de sodio a 0.5 %.

2º — Filtrar la carne cocida por medio de paño y adicionar al caldo después de filtrado, 1 % de peptona y 0.2 % de glucosa.

3º — Calentar este caldo hasta la disolución de la peptona, agregando cantidad suficiente de soda hasta obtener reacción alcalina al tornasol.

4º — Hervir durante 1/2 hora y filtrar para remover el precipitado.

5º — Distribuir en frascos Winchester, 4 litros del medio y 2% de carne cocida.

6º — Esterilizar durante 3 horas a 33 libras.

7º — La reacción final del medio asi preparado tiene acidez variable: de 3 a 4% titulada com fenoltaleina como indicador.

Es de notar que la peptona es indispensable para la formación de la toxina. No así la calidad, pudiendo usar-se cualquiera de las conocidas pues no diferen notablemente; es de notar también que la reacción del medio tiene efecto definido sobre el crecimiento y que la adición de músculo fresco o extracto de carne recientemente preparado, favorece indiscutiblemente la producción de la toxina.

B. — El Comité Permanente de Standardización Biológica de la Liga de las Naciones (26) aconseja el medio siguiente:

1° — A caldo hecho con extracto de carne, adicionar 3% de Proteosa Peptona Difco y 0.5% de cloruro de sodio.

2° — Distribuir en frascos de Winchester la cantidad de 2 litros en cada uno, agregando 10% de carne cocida. Ajustar el pH a 8.0 y esterilizar evitando el calentamiento excesivo. El medio es enfriado a 37° C y sembrado com 25 c.c. de cultivo de 12 a 14 horas en medio de la misma composición.

C. — En el medio de Walbum y Reymann (40) se producen óptimas toxinas. Tiene la composición siguinte::

1° — Caldo de ternera común com peptona Riedel a 1%.

2° — Antes de esterilizar, ajustar la reacción a pH 8.0. Si después de autoclavar estuviere a pH 7.8 ó 7.6, no es necesario realcalinizar el medio.

3° — Distribuir en frascos en la cantidad de 1 litro en cada uno.

4° — En el momento de sembrar adicionar 0.25% de glucosa y 20 a 30 gramos de carbonato de calcio por cada litro de medio. Hervir durante 2 horas, agregar 200 gramos de parafina liquida estéril, continuando el calentamiento por 1 hora más.

En cloruro de calcio es necesario para evitar la destrucción de la toxina por los ácidos formados. El medio debe ser agitado frequente y continuamente. Sembrar 1 c.c. de cultivo de 20 horas (varias subculturas "meat medium" con parafina liquida) en 1000 c.c. de medio. La producción máxima es obtenida con incubación de 10 a 11 horas a 37° C o después de 21 a 24 horas a 31° C. La D.M.L. obtenida con esta toxina es de 0.015 a 0.03 c.c. (en lauchas por via venosa), no siendo necesaria la adición de carne cocida en el fondo del tubo.

La toxina de acción fulminante de Kojima (22) no es producida en cantidades apreciables en los medios conteniendo menos de 0.75% de glucosa. Con 2.25% de glucosa, esta substancia se produce en cantidades apreciables. La toxina genuina es más estable a pH 6.0 ó 7.0.

D. — El medio de cultivo que nos ha proporcionado toxinas de tenor más elevado y que nosotros aconsejamos para la producción de la toxina es el siguiente:

Higado	500 gramos.
Peptona Chapoteau o	
Neopeptona Difco o	
Peptona Witte o	
Peptona Bac. de	
Park-Davis	10 gramos.
Agua destilada	1000 c.c.

1º — Se pasa el higado por la máquina, agregándole el agua y dejando a macerar por 12 horas.
2º — Hervir a fuego lento durante 15 minutos.
3º — Colar en paño y filtrar por papel de filtro nº 50.
4º — Agregar la peptona, previamente disuelta.
5º — Ajustar el pH a 7,8.
6º — Llevar al autoclave a 120º C. durante 20 minutos.
7º — Filtrar de nuevo por papel.
8º — Distribuir en balones con 500 c.c. en cada uno, agregando 10% (más o menos) de trozos de higado y vaselina liquida.
9º — Esterilizar a 115º durante 30 minutos.

En el momento de usar para la siembra, calentar los frascos a 70º C. en baño maria, enfriando bruscamente a 37º C. La siembra debe practicarse con culturas de *Cl. perfringens* de 12 a 14 horas efectuados en medio de igual composición.

Condiciones que favorecen la producción de toxina

a) La agitación.
b) La adición de clururo de calcio que impide que el pH baje de 6. La toxina genuina especifica se conserva mejor con pH 6.0 ó 7.0. La hemolisina se conserva mejor con pH 5 conforme verificó Walbum (39).
c) A 31º C la produción de toxina es más lenta. A 37º C se obtiene crecimiento óptimo en 18 a 24 horas de incubación.
d) La adición de carne fresca estéril o de higado cocido aumenta 5 veces más la toxicidad del filtrado.
e) La cantidad de medio de cultivo. Nosotros aconsejamos 500 c.c.
f) La adición de sangre desfibrinada o de suero de caballo.

Condiciones que atenuan la toxina

a) La filtración.
b) La permanencia en la estufa por más de 24 horas.
c) La falta de calentamiento previo, del medio.
d) La ación de la luz solar sobre el medio, aún antes de sembrado.
e) La permanencia prolongada del medio de cultivo en la temperatura ambiente.
f) El envejecimiento, mismo a baja temperatura.
g) La acidez del medio. La toxina de *Cl. perfringens* tipo A se atenúa francamente en los medios ácidos, siendo necesario ajustar el pH a 7.0 a fin de conservarla en estado liquido.

Siembra

La siembra será hecha después de calentar el medio hasta ebulición durante 1 hora, y enfriado rápidamente en agua corriente o por medio de um ventilador

Puede hacerse la siembra con fragmentos de músculos de paloma, inoculada en el músculo pectoral con cultivos originados en caldo o en agar. Las culturas hechas directamente con cultivos en caldo deberán ser cultivadas varias veces en tubos conteniendo medios de la misma composición que el medio que va a servir para la producción de toxina.

Periodo de incubación

No es necesario adoptar para el crecimiento del *Cl. perfringens* métodos especiales de anaerobiosis. Un medio recubierto con parafina líquida o vaspar recientemente esterilizado al autoclave o recalentado y bruscamente enfriado, ofrece condiciones de anaerobiosis satisfactorias para la producción de toxina. El período de incubación varia con los autores; algunos aconsejan 10, otros 13, 18 y 24 horas.

Después de numerosas experiencias, encontramos el periodo de incubación óptimo, de 18 a 24 horas para la producción máxima de nuestras toxinas.

Las toxinas tipo Ov son obtenidas después de 3 dias de incubación y las de tipo D después de 5 dias.

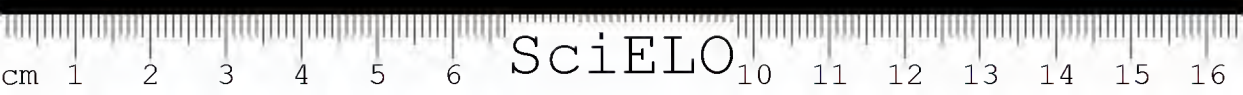
Obtención de la toxina

Se obtiene por filtración y por centrifugación. La centrifugación debe durar de 20 a 30 minutos hasta la obtención de un liquido límpido.

Antes de la dosificación conviene hacer una prueba de crecimiento en agar Veillon a fin de verificar si ha habido crecimiento abundante. Usar también los procedimientos nefelométricos con este objeto.

Determinación de D.M.L.

Las técnicas usadas por los distintos autores son las siguientes:

Bull (1917) Bengston (1920)	: 0.1 c.c. D. M. L. en palomas via muscular.
Dalling, Glenny y Mason y O' Brien (1928)	: 0.1 — 1 c.c. D. M. L. en lauchas vía muscular.
Los mismos	: 0.01 — 1 c.c. D. M. L. en lauchas vía venosa.
Klose (1916) Glenny y Allen (1921)	: 0.01 — 1 c.c. D. R. M.
Henry (1917) Weinberg (1928)	: 0.01 — 1 c.c. M. H. D. hemolisina **in-vitro.**
Weinberg y Seguin (1917)	: 0.5 c.c. D. M. L. lauchas vía cutánea.
Sordelli, Asúa y Ferrari (1929)	: 6 mgs. D. M. L. cobayo viia peritoneal.

Nosotros usamos palomas y lauchas blancas, preferentemente lauchas blancas de 17 a 20 gramos, empleando la vía venosa (1).

Preparación de la toxina seca

Para los dosajes por vía venosa se usan volúmenes muy pequeños de toxina. De aquí la conveniencia de conservar secas las toxinas. Preparamos de acuerdo al siguiente procedimiento:

1º — Precipitar por el sulfato de amonio purísimo (750 gramos de sulfato de amonio por 1000 de toxina fresca centrifugada).

2º — Agitar con una varilla de vidrio durante 1 hora.

3º — Recoger la espuma sobrenadante.

4º — Colocar en un cristalizador quitándole por expresión la mayor parte del sulfato de amonio.

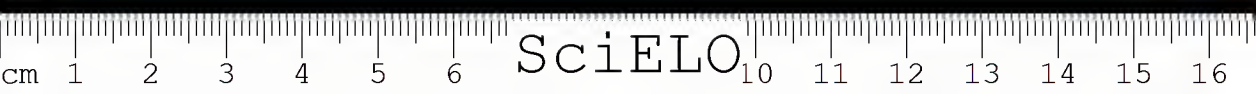
5º — Distribuir la espuma sobrenadante en tubos serológicos de dosaje, 0.5 cc en cada tubo. Secar en hielo seco a baja temperatura y en alto vacuo. Preparar hielo seco: colocar una bomba de C02 sobre una mesa. Adaptar un saco sobre el tubo de salida, abrir este tubo de salida dentro del saco. Batir bastante el saco, violentamente. Colocar el hielo seco en un recipiente con alcohol. Disponer un secador Hempel con glicerina. Antes de usar este secador retirar todo el aire de la glicerina hasta que no salgan más borbujas.

6º — Agitar rápidamente los tubos conteniendo la toxina a-15° C. ó-10° en la mezcla de hielo seco y alcohol. Toda la toxina se deposita en las paredes lo que facilita el secado.

7º — Enjugar los tubos por fuera (a fin de retirar el alcohol y el C02). Colocar immediatamente dentro de secaderos modelo Hempel sin tapa, contendo acido sulfurico e cloruro de calcio. Pasar vaselina o vasoil por los bordes del secador. Colocar dentro un termómetro. Trasportar el secador a un frigore a-5° C. y ligar la bomba de alto vacuo hasta el manómetro de aire baje a zero. Bombear por 1 hora, verificando el termómetro, de manera que dentro del secador haya-5° C.
Conservar el secador cerrado en el frigore a-15° C. durante 24 horas.

---

(1) La definición classica de D. M. L. de toxina gangrenosa definitivamente establecida por Weinberg y Guillaume (59) y admitida en nuestros trabajos anteriores (34 y 35) considera como D. M. L. de uma toxina gangrenosa: la menor cantidad de esta toxina que inoculada en lauchas, de 17 a 20 gs., por via venosa mata el 50% de las lauchas inoculadas.

Benzoni, en trabajo reciente (2a) considera como dosis minima letal la menor cantidad de toxina que inoculada en lauchas, de 17 gs., por via venosa, mata 100% de las lauchas inoculadas.

8º — Retirar y pasar por tamiz fino.

9º — Dosar.

10º — Colocar en tubos especiales de conservación como los de la figura 1 ideado por Prausnitz. (30).

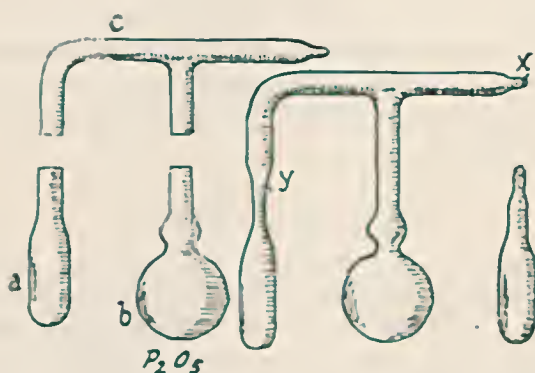



Fig. 1

La toxina es colocada en la ampolla *a;* el recipiente *b* es llenado con anhídrido fosfórico en polvo. Se suelda el aparato con lámpara de mecánico y se liga por el tubo X al vacuo. Se conserva esta ligación con el vacuo durante 30 minutos. Se suelda en X y se conserva en la heladera por 2 ó 3 meses. Agitar una que otra vez a fin de renovar las camadas de polvo de la superficie. Cuando se supone que nos últimos restos de agua han desaparecido se cierra en el punto marcado con la letra Y.

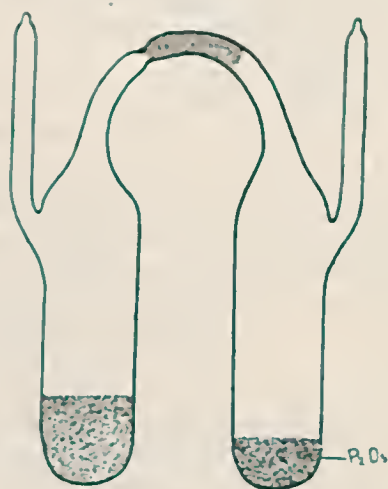



Fig. 2

El tubo de la figura 2 ha sido ideado por Rosenau (32). Es de vidrio y de color ámbar. Se introduce primero algodón hasta la constricción. Se coloca en uno de los bulbos 1 gramo de anhidrido fosfórico. Se cierra con llama la rama

por la cual se ha introducido el anhídrido. Se coloca cerca de 1,2 gramos de toxina seca en la otra rama y se liga esta rama al vacuo, dejándose así por una hora. Es necesario ligar el vacuo suavemente, de lo contrario la toxina sería aspirada. Conviene retirar todo el aire de la toxina antes de cerrar el tubo. Después de transcurridos dos meses, separar el anhídrido fosfórico y conservar el tubo en la heladera. Una vez abierto el tubo conservardo en un desecador con cloruro de calcio cobierto de papel negro, siempre con presión negativa dentro.

Las toxinas secas tienen una estabilidad muy grande. Nosotros redosamos las nuestras de seis en seis meses.

D. M. L. de la toxina seca

Diluir la toxina seca en solución salina fisiológica o caldo con pH 7,0 inoculando a lauchas de 17 a 20 gramos por vía venosa a la dosis total de 0,5 c.c.

Conviene aprovechar para toxina seca patrón solamente aquellas que tienen gran poder toxigénico. Las toxinas secas más débiles pueden usar-se para la inmunización de caballos.

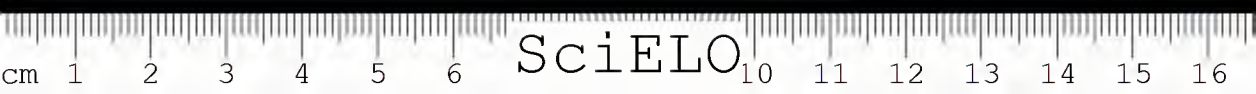
Acción de la toxina

A fin de poder observar los efectos experimentales de la inoculación de la toxina, es necesario conocer su acción.

Estudiando la acción de la toxina de Cl. perfringens, Nicholson (27) verificó que la acción de la toxina de Cl., perfringens es debida a la toxina del mismo y a una substancia semejante a la histamina encontrada por Kendall y Schmitt (18) en los filtrados de *Cl. perfringens.*

Sobre el *aparato circulatório,* nótase que la toxina causa notable aumento de la presión sanguínea. Este aumento se inicia gradualmente (dependiendo la acción del tipo de toxina inoculada), cayendo la presión rápidamente cuando el animal se aproxima a la muerte. La toxina C es la más activa de las toxinas. La toxina B tiene acción ligeramente más débil. Usando dosis proporcionales de estas dos toxinas, es imposible distinguir sus efectos por la observanción de las curvas de la presión sanguínea. Las toxinas A y D son mucho más lentas en su acción que las toxinas B y C, no causando tan rápidamente la elevación de la presión.

La acción de la toxina de *Cl. perfringens* se asemeja a la acción de la toxina de Vibrión séptico, que produce tanbién una elevación preliminar de la presión sanguínea, seguida de una detención y nuevamente uma elevación, terminando por una nueva detención final.

La mayoría de las experiencias sobre la acción de esta toxina, hicieron difícil decidir, si los latidos del corazón procedieron a la cesación de los movimientos respiratorios, o si éstos precedieron a la cesación de los movimientos cardíacos

En el caso de la toxina D, con todo, no hay duda, de que cesan primero los movimientos respiratorios antes que los movimientos cardíacos. Como el aumento de la presión sanguínea se produce, asimismo, cuando las toxinas son inyectadas en gatos decapitados con la médula destruida, es evidente, que el aumento de la presión sanguínea producida por la toxina, debe ser imputada a la contracción de los vasos periféricos. Además las toxinas de *Cl. perfringens* producen contracción coronaria, bloqueo cardiaco y fibrilación ventricular.

Sobre el *aparato respiratorio* los efectos de la toxina de *Cl. perfringens* se evidencian por una disminución del número de los movimientos respiratorios, decreciendo la amplitud de los mismos, siempre paralelamente a un aumento de la presión sanguínea. Estas modificaciones del estado general persisten hasta que la presión sanguinea comienza a caer, aumentando por el contrario los movimientos respiratorios en amplitud y en número, para cesar después súbitamente, en el momento de la muerte del animal.

Los cuatro tipos de toxina de *Cl. perfringens* producen efectos idénticos sobre el aparato respiratorio, variando solamente la intensidad de la acción de cada una. La disminución de la amplitud de los movimientos respiratorios es debida a la contracción de los músculos lisos de los bronquios y se constata, asimismo, administrando previamente atropina o dividiendo previamente ambos neumogástricos.

Sobre el *sistema nervioso central*. La inyección de 1 D. M. L. de toxina fue seguida siempre de una disminución de la repuesta a la estimulación del neumogástrico, lo que indica que durante el curso de la intoxicación existe progresiva depresión de los centros correspondientes a este par. Es razoable suponer que otros centros son también afectados, teniendo en cuenta que la toxina B posee afinidades por las células nerviosas llegando al cerebro por via sanguínea. La toxina del *Cl. perfringens* causa una contracción espástica sobre trozos aislados de corazón y útero, lo que demuestra su acción directa sobre los músculos involuntarios.

En cobayos inoculados por via venosa se constata la acción de la toxina sobre el sistema nervioso, por la aparición de una parálisis seguida de contracciones. Esta substancia paralizante y convulsionante es neutralizada por el suero específico, conforme demostraron Weinberg y Barotte en 1929. El suero antiperfringens es más antineurotóxico que antihemolitico.

Sobre el *aparato gostrointestinal* la toxina de *Cl. perfringens* tipo A tiene acción notable. Las lauchas, conejos y cobayos inoculados por via venosa con toxina de *Cl. perfringens*, presentan peristaltismo intestinal violento, acompañando de diarrea. Los vómitos que se notan en las palomas y en los enfermos de gangrena gaseosa en su periodo final, tal vez corran por cuenta de esta acción.

Sobre *la sangre*. Las toxinas de *Cl. perfringens* son fuertemente hemolíticas *in-vitro* e *in-vivo* Existirian dos toxinas hemotóxicas, A y B. La primera de acción *in-vitro* y la segunda de acción *in-vivo*. La toxina hemotóxica A puede ser obtenida en medio de Kahn y Torrey, produciendo lisis rápida de los glóbulos

rojos, siendo neutralizada por el suero anti A. La toxina hemotóxica B, es también obtenida en medio de Kahn y Torrey al cual se agrega trozos de músculo pectoral de paloma o 2 c.c. de sangre fresca estéril de conejo, que absorben la toxina A al final de las 18 a 24 horas. La toxina B es cuatro veces más tóxica que A, produciendo las modificaciones morfológicas de la sangre en las infecciones del *Cl. perfringens*. La acción combinada de las toxinas hemotóxicas y de las toxinas de acción necrosante, que alteran las paredes vasculares, explican las lesiones hemorrágicas tan frecuentes en las infecciones por el *Cl. perfringens*.

Orr, Campbell y Reed (28) mostraron que *in-vitro* esta toxina produce una evidente anisocitosis, muy semejante a la observada en la anemia perniciosa, iniciándose por una disminución del diámetro de los hematies (estado microcítico).

Posteriormente los hematies aumentan de diámetro (estado macrocítico), volviendo en seguida a aproximarse a la normal. Estas alteraciones del tamaño de los hematies no se produce con otras hemotoxinas, como *Cl. tetani, vibrion septique, Strepto scarlatinae, Staph. aureus*. Los hematies humanos son más sensibles que los de conejo.

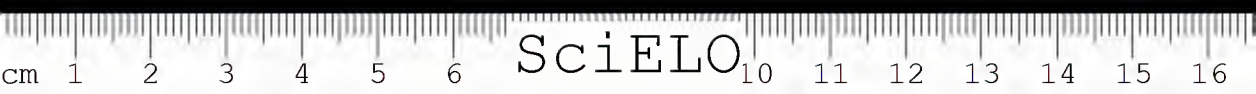
In-vivo produce esta toxina, notable disminución de los hematies. Bull (6) relató que una paloma que daba inicialmente 4.280.000 glóbulos rojos por c.c. después de 3 1|2 horas de inoculación, no daba más de 800.000 hematies por c.c. La toxina en dosis única o en varias dosis repetidas, produce en los animales inoculados anemias y grandes alteraciones de la sangre.

Las lesiones más graves son obtenidas por inyección subcutánea de cultivo.

En los períodos graves se puede constatar también graves alteraciones del cuadro hematológico: anisocitosis, hematies nucleados, hematies policromatófilos y células de Türck, pudiendo encontrarse a nivel del bazo, hígado y riñones, pequeños trazos oscuros de un pigmento melánico thio aminado debido a la aminoacidemia y a la thiohemia, causado por insuficiencia hepática grave y mal funcionamiento del hígado, riñones y suprarenales.

La acción hemolítica no es debida a la presencia de ácidos, pues con la neutralización química (pH) continúa produciéndose los mismos efectos.

Los enfermos infectados con *Cl. perfringens* presentan en el curso de la enfermedad, fenómenos hemorrágicos, hemorragias gastrointestinales, hemoptisis, hemoglobinurias y hematurias. Estas lesiones son debidas a dos factores: alteración de las paredes vasculares por la toxina necrosante y por la elevación de la presión sanguínea. La hemoglobinuria y la hematuria, es acompañada de intensa pigmentación de las células renales, células endoteliales de los vasos sanguíneos y células conjuntivas del endotelio intersticial.

Sobre los glóbulos blancos la toxina de *Cl. perfringens* ejerce acción leucoaglutinante. Este poder leucoaglutinante de la toxina es directamente proporcional a la virulencia. Es destruído por el calentamiento a 58°-60° C. en 30 minutos. No existe relación entre el poder leucoaglutinante de Cl. perfringens y su poder toxigénico.

La *acción necrótica* puede ser demostrada por los efectos de la toxina sobre la piel, por inoculación intracutánea o por inoculación intramuscular. Los músculos se vuelven edematosos, friables, tornándose finalmente en una pulpa difluente. Produce también un edema seroso y extenso del tejido subcutáneo; el líquido del edema no contiene células y coagula rápidamente dando un líquido de color amarillo claro. En la laucha este líquido es rojizo dando el espectro de la oxihemoglobina.

Sintomatologia

Después de las inoculaciones, las lauchas tórnanse disneicas, con movimientos respiratorios profundos y espaciados; en seguida sobreviene una serie de movimientos respiratorios lentos y superficiales. A veces el animal gira sobre si mismo, da grandes saltos, sobreviniendo una fase de paresia de los músculos de los miembros posteriores, que en ocasiones llega hasta el tronco, el animal procura sostenerse con auxilio de los miembros anteriores. Sobreviene luego una fase de quietud, de movimientos respiratorios muy rápidos y superficiales, los músculos entran en relajamiento y la muerte llega por parálisis flácida.

La hematuria es extremadamente frecuente: con dosis débiles demora un poco más en producirse la muerte: en estos casos el animal está triste, abatido, pierde el apetito, los pelos erizan, habiendo notable descenso de la temperatura. Se observa con frecuencia hematuria y diarrea.

Necropsia

La toxina de *Cl. perfringens* no produce sintomas patognomónicos. En las autopsias de lauchas, encontramos vejiga llena, con orina a veces sanguinolenta. Riñones congestionados e ingurgitados saliendo fuera de las cápsulas cuando éstas son cortadas. El higado con degeneración grasa circunscripta en placas o difusa. Aumento de liquido en las cavidades serosas, más particularmente en la cavidad pleural y pericárdica. El duodeno y parte del intestino delgado distendido con contenido teñido por bilis. El recto se muestra a veces lleno de gas con contenido semifluido. Las suprarenales están enrojecidas y el bazo aumentado de volumen. Estas alteraciones no son constantes. En las lauchas que sobreviven más de 6 horas después de la inyección tóxica Gortzen (15) señala edema abundante del vientre de color rosáseo, edema pulmonar y lesiones celulares generalizadas en la cápsula *renal*. No todos los animales presentan hemolisis intravital lo que hace aceptar la teoria de Prigge (31) de que no es la Alfatoxina la responsable de la acción letal de la toxina y si, un otro factor, la Zetatoxina que determina la muerte de los animales.

II — Preparación de suero antiperfringens tipo A

En las infecciones gangrenosas por *Cl. perfringens* existe desde el comienzo exuberante desarrollo bacteriano que conduce a las más graves alteraciones

tisulares, con creciente invasión de la corriente de los humores y de la sangre, por cada vez mayores cantidades de toxina. Por esta razón el suero antiperfringens debe ser antimocrobiano y antitóxico. La acción antimicrobiana es profiláctica y directa sobre el desarrollo y desenvolvimiento de los gérmenes. La acción antitóxica se ejerce sobre las toxinas elaboradas que pasan a la corriente de los humores y a la sangre. La acción antimicrobiana del suero antiperfringens puede ser monomicrobiano, actuando sólo sobre el *Cl. perfringens* tipo A o tipo Welch; o polimicrobiano, actuando contra todos los tipos de *Cl. perfringens*, esto es, un holo-suero antiperfringens, activo al mismo tiempo contra tipo A (tipo Welch), tipo B (L D bacillus B. agnis, 1928), tipo C (Bacillus paludis, 1930), tipo D (B. de Wilsdon, 1931) y tipo Ov (Bacillus ovitoxicus, 1932).

Las toxinas de los varios tipos de *Cl. perfringens* sólo serán eficazmente neutralizadas por un suero antiperfringens poliantitóxico, que ejerza acción neutralizante contra sus hemolisinas, hemoaglutininas, leucoaglutininas, miotoxinas, hepatotoxinas y necrotoxinas.

Inmunización

El animal de elección para la preparación de los varios tipos de sueros antiperfringens, es el caballo.

Cuidados especiales deben ser tomados. Múltiples causas pueden impedir la inmunización y la obtención de sueros antiperfringens activos. La muerte de los animales en servicio es frequente, debido a que, la inmunización es hecha con toxinas centrifugadas, ricas en gérmenes vivos, a la producción de pseudotoxina de acción letal aguda producida en los medios altamente glucosados, a la falta de gradación de los efectos tóxicos de la toxina en relación al "limiar" de inmunidad activa adquirida en el curso de la inmunización, y a los efectos tóxicos sobre los diferentes tejidos y órganos ocasionando su degeneración, miopráxia funcional y su consecuente caquexia.

La inmunización se inicia con anatoxina filtrada (la filtración atenúa mucho la toxina) mixturada con un suero antigangrenoso polivalente (sólo en la primera dosis), pasándose después a anatoxina centrifugada, más cuerpos microbianos inoculados directamente en la vena o mixturados con anatoxina. Alcanzado 300 c.c. de anatoxina, se practica una sangria de prueba; si el suero tiene un título conveniente se pasa a toxina centrifugada pura o asociada a cuerpos microbianos, pudiendo estos últimos inocularse separadamente en la vena.

La via de inoculación será subcutánea para la toxina y venosa, en ciertos casos, para cuerpos microbianos. El periodo de intervalo de una a otra inyección, una semana.

Preparación de los cuerpos microbianos

1º — Centrifugar los cultivos.

2º — Diluir el depósito de centrifugación en 10% c.c. de solución salina, en relación al volumen centrifugado.
3º — Agregar formol al 4 por mil en proporción al cultivo centrifugado.
4º — Agitar vigorosamente.
5º — Dejar en la stufa durante 4 dias a la temperatura de 37º C.
6º — Verificar esterilidad para aerobios y anaerobios.
7º — Lavar los cuerpos microbianos en agua fisiológica dos veces seguida, centrifugando cada vez y agregando nuevamente agua fisiológica.
8º — Recoger el depósito en Placa de Petri con mínimo posible de líquido.
9º — Secar al vacuo sulfúrico.
10º — Triturar en mortero.
11º — Pesar la cantidad total obtenida a fin de hacer las proporciones entre la toxina bruta y la cantidad de cuerpos microbianos obtenidos.

Importante — El grado de dilución tiene gran importancia. Emulsiones poco voluminosas y muy densas provocan abcesos. Diluciones muy voluminosas provocan placas de induración en el punto de inoculación y a veces grandes abcessos que pueden prejudicar o interrumpir las inoculaciones siguientes. Es necesario pues, usar volúmenes medios, dosis de 50, 100 ó 150 c.c. que deberán ser inoculados de acuerdo al peso de los microbios a inyectar.

Preparación de anaculturas

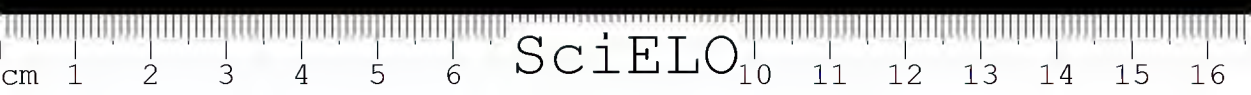
Preparamos nuestras anaculturas de acuerdo a la técnica recomendada por Weinberg y Prevot (54), adicionando a la toxina bruta, formol al 5 por mil y dejando en la estufa a 37º C. durante 8 dias.

Control: El control de inocuidad de la anacultura se obtendrá inoculando de 10 a 20 c.c. por via intracutánea al cobayo. No debe provocar más que una ligera tumefacción

III — Dosificación del suero antiperfringens tipo A

Naturaleza del Patrón

La preparación es hecha de acuerdo a las Reglamentaciones (1931) y según lo establecido por Therapeutique Substances Act (1925).

La Unidad de antitoxina de Gangrena gaseosa (perfringens), es la actividad neutralizante especifica para la toxina de gangrena gaseosa (perfringens) contenida en aquella cantidad de preparación Patrón de antitoxina, que es exactamente equivalente a 0.322 mgs de la preparación seca y estable de suero Patrón americano. Esta Unidad aceptada para uso internacional es idéntica a la Unidad adoptada en los Estados Unidos de América por National Institute of Health (1).

Preparación del Patrón

Es preparado de suero separado de sangre de un caballo inmunizado contra toxina de gangrena gaseosa (perfringens), después de pruebas preliminares para asegurar que la antitoxina tiene un poder antitóxico conveniente para ser usada como Patrón. El suero natural es reducido a estado seco usando los medios conocidos, preservado en ampollas al abrigo de la luz y mantenido a la temperatura de 4° C.

El Patrón, de acuerdo con Therapeutique Substances Act (1925), es disuelto en solución glicerinada (glicerina 2 partes, solución salina 1 parte), 1 c.c. de la solución Standard contiene 20 Unidades.

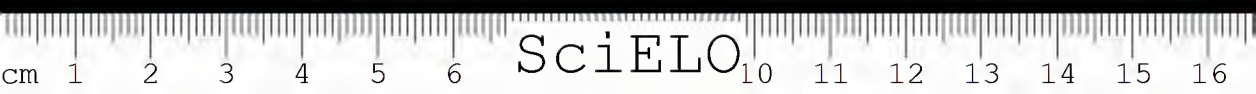
Uso del Patrón

El poder antitóxico en unidades de antitoxina de gangrena gaseosa (perfringens), es determinada por inyecciones en animales (palomas o lauchas blancas), de uma mixtura de la antitoxina en prueba, con la toxina de gangrena gaseosa (perfringens) que fue Standardizada en relación de la Antitoxina Patrón de gangrena gaseosa (perfringens).

Puede ser usado cualquier animal y adoptado cualquier método para la dosificación de la Antitoxina de la Gangrena gaseosa (perfringens), toda vez que, se relacionem los valores obtenidos con el Standard internacional, ya que las determinaciones de los valores de un suero sólo tienen un sentido práctico, cuando el valor obtenido da la medida de sua actividad.

Animales usados

Para la Standardización de la Antitoxina de la Gangrena gaseosa (perfringens) puede usarse palomas, cobayos o lauchas blancas. El Comité Permanente de Standardización Biológica de la Liga de las Naciones, recomienda de preferencia las lauchas blancas, por ser el uso de este animal, más simple, rápido, económico y preciso. Nosotros usamos lauchas de la misma generación y con peso uniforme de 17 a 20 gramos, de acuerdo a las recomendaciones de dicho Comité Permanente.

Con el fin de establecer la comparación final, es recomendado grupos de 6 lauchas para cada mixtura de toxina-antitoxina. Con este número de lauchas se puede conseguir una precisión en los dosajes de más o menos 4 %. El período de observación es de 48 horas; la mayoría muere durante las primeras 24 horas, ocurriendo muy pocas muertes después de las 48 horas.

El National Institute of Health de Washington recomienda el uso de palomas por vía muscular, en virtud de su mayor sensibilidad. Bengtson (1) verificó que la dosis de prueba de una toxina recientemente preparada, habiendo sido de 0,021 grs para la paloma de 350 gramos, fue de 0.0044 para las lauchas. Si la sensibilidad de los animales fuera la misma, la dosis de prueba de 0.0044 mgs para la laucha de 20 gramos, se elevaria a 0.079 mgs para la paloma, siendo en realidad un cuarto de esta dosis.

Toxina Patrón para los dosajes

Para la dosificación de suero antigangrenoso (perfringens) es esencial contar con una toxina de la Gangrena gaseosa (perfringens), estable y exactamente standardizada en relación a la Antitoxina Patrón. Aprovechamos en el Instituto Butantan, las toxinas, que dosan arriba de 60 D M L por c.c. y que dan un Test-dosis de 0.002 mgs.

Determinación de test-dosis de toxina perfringens por el metodo de inyecciones venosas en lauchas blancas

Definición: Test-dosis (Lt) internacional de toxina perfringens, es la cantidad de toxina perfringens que, mixturada con 1/5 de Unidad de Antitoxina perfringens Patrón, provoca la muerte de algunas, pero no todas las lauchas inoculadas.

Test-dosis Francesa (Weinberg y Guillaumie), es la cantidade de toxina que unida a la Unidad antitóxica de un suero Patrón francés, provoca la muerte de la mitad de las lauchas inoculadas.

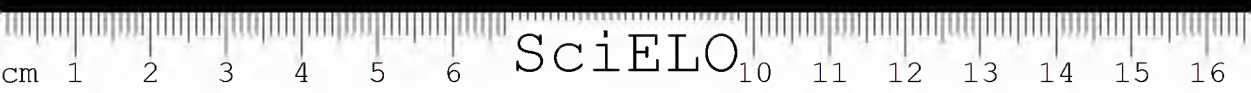
Unidad de toxina, es la cantidad de toxina correspondiente a 20 D M L de una toxina dada. Una de las razones por la cual el título antitóxico de un suero determinado con el test-dosis de una toxina, es generalmente superior al que se obtiene cuando se utiliza la unidad de toxina, es que el test-dosis establecido por medio del suero Patrón representa generalmente un número inferior a 20 D M L.

Para la determinación de Test-dosis preparar las siguientes diluciones:

a) 1 c.c. de antitoxina perfringens Patrón internacional es diluída de manera que 1 c.c. de la diluición contiene 1 Unidad de Antitoxina Patrón perfringens.

b) Una cierta cantidad de toxina seca es rigurosamente pesada y disuelta en solución con pH 7.0. El volumen debe ser ajustado de tal manera que 10 miligramos de toxina estén contenidos en 1 c.c. de dilución.

Las mixturas de la dilución de Antitoxina Patrón perfringens y de la dilución de Toxina son hechas en un volumen total de 0.5 c.c. (cantidad a ser inye-

ctada en cada laucha), la cual deberá contener 0,2 c.c. de Antitoxina diluída (1/5 de Unidad) más cantidades variables de la dilución de Toxina.

Las mixturas son dejadas a la temperatura ambiente durante 45 ó 60 minutos, inyectándose 0,5 c.c. por vía intravenosa en lauchas.

Los animales son observados durante 48 horas. La mayoria de ellos muere en las primeras 24 horas, ocurriendo pocas muertes después de las 48 horas.

Cuando la dosis es aumentada todas las lauchas mueren, y cuando la dosis es disminuida algunas quedan tristes, otras con hematuria, pero ninguna muere. Es necesario usar para cada dosis de 6 a 12 lauchas con el fin de determinar con precisión las curvas porcentuales.

Después de varios dosajes efectuados por nosotros, pudimos comprobar que el test-dosis hallado, contenía una media de 18 a 20 D M L.

Dosaje de la antitoxina de la gangrena gaseosa (perfringens) de valor desconocido

(Ensayos previos)

Preparar las diluciones siguientes:

a) — Dilución del suero en prueba.

b) — Preparar la dilución de la toxina Patrón.

1 Test-dosis de toxina, es rigurosamente pesada y disuelta en solución salina fisiológica, de manera que 1 test-dosis esté contenido en 0,2 c.c.

Mixturas de diluciones de suero a dosar con el test-dosis, son hechas en un volumen total de 0,5 c.c., la cual debe contener cantidades variables del suero en prueba diluído, más 0,2 c.c. del test-dosis y más la cantidad necesaria de solución salina para completar el volumen total de 0,5 c.c.

La cantidad sobrante de solución salina debe ser aprovechada a fin de lavar el tubo de dosage y emplear totalmente la dilución a inocular. Las mixturas antes de usarlas son mantenidas de 45 a 60 minutos a la temperatura ambiente.

La cantidad de 0,5 c.c. es inoculada intravenosamente a 4 lauchas blancas de 17 a 20 gramos, mantenidas a temperaturas constantes en los climas variables.

Tanto para la preparación de las diluciones, como para la prática de las inyecciones, deben usarse pipetas y jeringas distintas (una para cada dosis).

Efectuadas las inoculaciones, observar las lauchas durante 24 a 48 horas.

Testigos. — Los testigos se inoculan con una mixtura de 1/5 de Unidad de suero Patrón con 1 test-dosis y en cantidades minimas, superiores o inferiores a 1 test-dosis.

Estos testigos indican si la cantidad de toxina empleada, como test-dosis es exacta o si hubo una variación en más o en menos.

La cantidad de animales sobrevivientes indican la exacta protección conferida por el suero en prueba.

Dosajes definitivos

La técnica del dosaje definitivo es la misma empleada en los ensayos previos, sólo que en estos casos, debe aumentarse la cantidad de animales a 10, haciendo las diluciones aproximados a los títulos obtenidos.

B. — Holosuero antiperfringens

Cepas. — Para la preparación de holosuero antiperfringens necesitamos de los diferentes tipos de *Cl. perfringens* a fin de conseguir las diferentes especies de toxinas.

El Instituto Butantan posee en su colección los siguientes tipos de *Cl. perfringens*:

Cl. perfringens tipo Welch, 34 cepas.

Lamb dysentery bacillus strain 5 recibido por especial obsequio del Dr. C. Reymann de Statens Seruminstitut de Copenhague.

Bacillus of lamb dysentery — Miss M. Robertson, U. 15, Col. 4 Lamb Dysentery. Isolated by T. Dalling, Welcome Physiological Research Laboratories, Beckenhan 1930, N.º 3110 da N. C. T. C.

Bacillus paludis — C. T. 40 isolated by A. D. Mac Ewen, Inst. for Research in Animal Pathology, Camden Town, N. W. fron lesions of sheep suffering fron "struck" or "gangrene" 1930, Nº 3178 da N. C. T. C.

Bacillus paludis — Wye 3 isolated by A. D. Mac Ewen. Used by Miss R. Robertson in animal tests 1930, Nº 3227 da N. C. T. C.

Bacillus ovitoxicus — H. W. Benneth, Perth, W Australia R 1 Sheep intestine Nº 3752 da N. C. T. C.

Las diferentes muestras y los diferentes tipos tienen capacidad toxigénica muy variable. Cada uno de los tipos muestran fluctuaciones individuales nítidas de tiempo en tiempo en su capacidad toxigénica. Estas fluctuaciones constantemente señaladas, no pudieron ser enteramente alejadas hasta hoy.

Para aumentar la toxigenia es aconsejable el pasaje de las muestras por músculo pectoral de una serie de palomas. Esta técnica da buenos resultados en un número reducido de casos. El crecimiento abundante y vigoroso es siempre indicio de una buena producción de toxina. Por eso cuando los cultivos son conservados en stock por mucho tiempo, es necesario repicarlos varias veces en medio con carne cocida, a fin de colocarlos en la fase de crecimiento logaritmico, consiguiéndose asi una producción máxima de toxina. A veces estos tipos pueden perder la capacidad de producir algunos de sus factores antigénicos. Borthwick (4) notó que las muestras del tipo D recientemente aisladas del intestino del perro tienen tendencia a simplificarse pasando para el tipo A.

Medios de cultivo

Los siguientes medios son aconsejados por Borthwick (4):

1° — "Cooked meat medium" con 1 % de Lab Lemco, 1 % de peptona Hopkins Williams y 0,5 % de cloruro de sodio.

2° — "Meat medium" preparado con extracto de carne.

3° — "Meat medium" preparado con extracto de carne más 1 % de peptona Witte.

4° — Caldo de ternera fosfatado conteniendo 1 % de peptona Fresne; 0,1 % de glucosa; 0,2 % de fosfato de potasio y carne cocida en el fondo. Con este medio se puede obtener buenas toxinas de los diferentes tipos.

El caldo V F tal como la formula el Instituto Pasteur fue usado por Turner (citado por Wilsdon), por Wilsdon (53) y por Weinberg y Guillaumie (41). La reacción del medio V F es ajustada a pH 7,6 y glucosado a 0,2 %.

Nosotros usamos el caldo-hígado con trozos de hígado, que ya hemos mencionado para la producción de las diferentes toxinas de los diversos tipos de *Cl. perfringens.*

Siembra

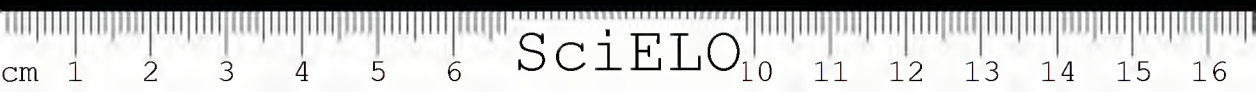
Luego de esterilizado el medio y enfriado a 40°C. hacemos la siembra con pipeta de bola y cerca de 20 c.c. de cultivo joven, de intenso crecimiento en medio fluido. Se puede sembrar también fragmentos inoculados de músculo pectoral de palomas.

Periodo de incubación

Ninguno de los tipos de *Cl. perfringens* exigen condiciones especiales de anaerobiosis. Bastan los cuidados recomendados más arriba, para obtener un buen crecimiento. Para los tipos A, B y C basta incubar de 18 a 24 horas, a fin de obtener una buena toxina. Para los tipos D y Ov es necessario 48 e 120 horas para obtener el máximo teor tóxico.

Obtención de las toxinas

Pueden ser obtenidas por filtración o por centrifugación.

El filtrado puede hacerse usando bujías Berkefeld o filtro Seitz sobre presión negativa de 15 centímetros de mercurio. Debido a cierta variantes mucoides que dan consistencia viscoso-gelatinosa al medio, es conveniente, sin embargo, usar

presión negativa mayor, hasta 25 cms. Esta tendencia a la viscosidad del medio fue estudiada por Gaughey (11). La viscosidad del medio causa grandes transtornos para la filtración; hasta ahora tal dificultad no ha sido totalmente resuelta; la adición de tierra de infusorios dirime en cierto modo tal inconveniente. Esta substancia es colocada en la superficie del medio y cuando el liquido se torna claro, se decanta y se filtra.

Resolvemos parcialmente las dificultades en la filtración de las toxinas B, C y Ov, combinando dos filtros Seitz, una mayor con capacidad de 2 litros munido de placas clarificantes puestas en conexión con un filtro menor munido de placas esterilizantes. Con una bombona de hidrógeno, nitrógeno o CO2, hacemos que se ejerza en el filtro mayor, una presión de 1 a 1.5 atmósferas. Se evita la formación de grandes cantidades de espuma y se consigue una filtración estéril mucho más rápida, con pequeña baja del tenor tóxico en relación a la toxina centrifugada.

Propriedades de las toxinas de los diversos tipos de **Cl. perfringens**

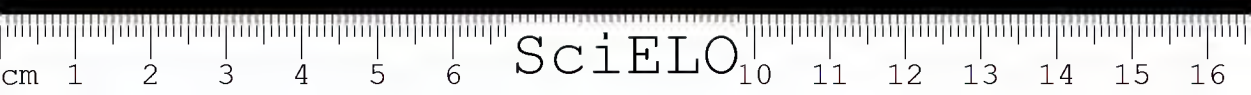
Toxina de **Cl. perfringens** *tipo A. tipo Welch.* Sus propiedades y su acción fueron descriptas en páginas atrás.

Toxina de Lamb dysentery bacillus o Bac. agni, tipo B. — Su producción máxima es obtenida después de un periodo de incubación de 15 a 24 horas. El pH del medio cae mucho llegando a 6,5 siempre que haya buena producción de toxina.

Es muy inestable. Dos o tres semanas después de preparada se torna prácticamente inerte, mismo, conservada a baja temperatura. La caída del poder tóxico es mucho más lenta quando el pH de la toxina es sostenida a 7.0. En estos casos se puede aun verificar cierto poder tóxico después de 3 meses. Es completamente destruida por calentamento a 60° C. durante 15 minutos. La incubación por 3 días en presencia de 0,1 % de formol torna la toxina atóxica. El poder hemolitico varía de acuerdo con las muestras que sirvieron para la preparación de toxina, pero nunca et tan acentuado como en el tipo A.

El poder necrosante es muy acentuado. Glenny, Llewellyn-Jones Masson. (14) señalaron que "The reaction produced by this toxin is almost entirely of a necrotic nature". La D M L para las lauchas varía de 0,01 a 0.0001 c.c. Los síntomas aparecen muy hápidamente y la muerte se produce en período relativamente corto. La muerte más o menos rápida está ligada a la riqueza mayor o menor del componente Z de la toxina. La acción de este componente de la toxina tipo B, se aproxima mucho por esta propriedad de provocar la muerte fulminante o rápida, a la acción del factor tóxico de Kojima de la toxina tipo A.

En las lauchas, las toxinas producen aceleración de la respiración con disminución de la amplitud de los movimientos respiratorios, espasmos musculares cló-

nicos, taquicinesia, movimientos rápidos y desordenados. El animal amenaza violentamente con grandes saltos. Después de algún tiempo las dificultades respiratorias se acentúam y la muerte se produce por parálisis de los centros respiratorios. No se observa nunca hematuria en las lauchas inoculadas con toxina tipo B. En la toxina de tipo B, Wilsdon (56) identificó el componente Z en mayor porcentaje y W en cantidad menor; el componente X está presente en proporción restringida en toxinas obtenidas con 24 horas de incubación. Después de 3 días de incubación a 37° C la cantidad de componente X aumenta, volviéndose la toxina, al mismo tiempo, más termoestable.

Por Glenny, Llewellin-Jones, Masson y Dalling (14) fueron descriptas en esta toxina los componentes beta, gama y delta. El componente epsilon no es constante; con el tiempo las muestras de L D puedem perder su capacidad de producirlo.

Toxina de Bac. paludis o tipo C. — Su produción máxima es obtenida con 18 a 24 horas de incubación a 37° C. La reacción del medio, al contrario de lo que acontece con la toxina L D B, no cae de pH 7.0. Esta toxina es notablemente estable. Wilsdon (56) cita el caso de una toxina con D M L originariamente de 0.0005 c.c., después de conservada a la temperatura de 5° C durante 8 meses, tenía todavia una D M L de 0.05 c.c., atribuyendo esta estabilidad, en gran parte, a la reacción del medio, pues la toxina tornóse rápidamente inerte en medios ácidos. Es más resistente a la acción del formol que la toxina B, siendo necesario agregar 0.5 % de esta substancia y dejar la toxina durante 14 dias a 37° C. para que se vuelva atóxica.

La toxina es completamente destruida calentándola a 60° C durante 15 minutos. Produce como la toxina del tipo B extensa área de necrosis cutánea en los tejidos vivos. Todas la muestras de toxina de Bac. paludis dan toxinas hemoliticas. La media de D M L para las lauchas es de 0.0005 c.c. y los animales muestran los mismos síntomas que con la toxina tipo B. La muerte sobreviene rápidamente debido a la riqueza de la toxina en componente Z. Este componente Z existe en mayor cantidad en la toxina C que en B. Además del componente Z encontramos en la toxina C el componente W. En el tipo C, se encuentra la toxina alfa en proporción 40 veces menor que en el tipo A; beta que es el componente de este tipo confiere su propiedad necrosante a la toxina de este tipo; gama tal vez esté presente en el tipo C; delta confiere a esta toxina su propiedad hemolitica.

Toxinas del Bac. D y Bac. Ovitoxicus, tipo D y Ov. — Contrariamente a lo que ocurre con las demás toxinas del grupo perfringens, estas toxinas son producidas en la fase catabólica, después de un crecimiento de 2 a 5 dias a 37° C.

Em vez de ser exotoxinas solubles, como las toxinas de los demás grupos, son tal vez, endotoxinas solubles, liberadas por la disgregación de los cuerpos microbianos y difundidas en el medio ambiente. La reacción del medio de cultura

raramente cae por debajo de pH 7.0. Las toxinas son relativamente estables y no pierden enteramente su poder tóxico después de 6 meses de frigorífico. No resisten a la acción del formol: 0.2% a 37° C durante 4 días, torna estas toxinas atóxicas. Una cualidad característica de esta toxina es su resistencia al calor. Mismo después de su calentamiento a 100° C durante 1 hora, no se vuelve completamente atóxica, siendo todavía capaz de matar lauchas en la dosis de 0.5 c.c. y producir signos nítidos de intoxicación en conejos en la dosis de 2.5 c.c. El componente responsable de esta termoestabilidad, es el componente X y es probable que este componente X sea idéntico al descripto por Kendal y Schmitt (18) en 1926. Posee un evidente poder hemolítico, no tan marcado como en la toxina del tipo A. La D M L para las lauchas, varía entre 0.1 c.c. a 0.00025 c.c. El tiempo entre la inyección y la muerte del animal es relativamente largo, exceptuando cuando se usa dosis fuertes de toxina. La sintomatología se aproxima a aquella producida por la toxina del tipo A y difiere de la sintomatología provocada por las toxinas de los tipos B y C. La hematuria es a veces observada. No produce necrosis extensas del tejido como en los casos de las toxinas de los tipos B y C.

Dosaje de las toxinas

Determinación de D M N. — Dosis mínima necrosante es la menor dilución de toxina que. puede aun en la dosis de 0.2 c.c. inyectada intradérmicamente en el animal de prueba, producir necrosis circundada por un anillo de eritema bien definido en el 2° ó 3° día.

La reacción causada por la inyección de la toxina del *Cl. perfringens* tipo A, comienza por una zona purpúrea nítida con necrosis poco evidente. Después de 4 horas, el sitio de la inyección muéstrase de color acentuado y necrótico; a las 18 horas es posible hacer una buena lectura, obsérvase entonces una zona de necrosis con tendencia a invadir el vientre. La toxina tipo D produce idénticas reacciones y de igual intensidad.

La reacción necrótica producida por la toxina del tipo B, es siempre muy extensa y acentuada; la inyección de pequeñas D M N produce rápida y visible reacción en 2 ó 3 horas. Considerable cantidades de toxina pueden ser inyectadas sin causar la muerte del cobayo. La toxina C. produce reacciones un poco menos intensas.

El método intracutáneo ofrece ventajas en el dosaje de las toxinas B y C, porque siendo su acción muy violenta, causando la muerte de las lauchas rápidamente y en dosis mínimas, se hace muy difícil sorprender las diferencias del poder tóxico de las diversas toxinas, por vía venosa.

Para determinar la D M N de una toxina dada, es necesario disolver dosis variables de esta toxina en un volumen total de 0.2 c.c. en solución salina con pH

7.0 e inocular en los flancos de cobayos albinos con pesos de 300 a 400 gramos. En cada flanco serán practicadas 5 a 6 inyecciones. La experiencia enseñará los puntos más adecuados. Hemos verificado que no todos los cobayos reaccionan bien; la intensidad reactiva varía mucho y es necesario tenerla en cuenta cuando se desea dosar toxinas o antitoxinas perfringens por vía subcutánea.

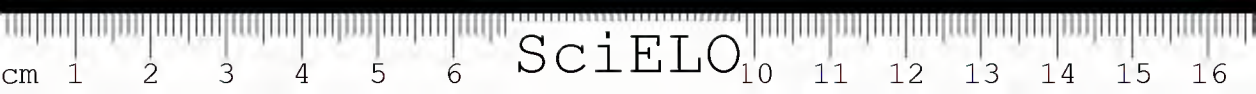
Antes de comezar a hacer uso de estos métodos, es aconsejable que cada investigador estudie el aspecto de las reacciones producidas en la piel del cobayo, frente a cada una de las toxinas de los diversos tipos de *Cl. perfringens*, siendo necesario usar siempre para los preparados de toxina, medios de cultivos idénticos, siguiendo la misma técnica para la desecación de la toxina, y empleando el mismo volumen total. Los flancos del cobayo, serán tratados por un depilatorio a base de sulfuro de bario; después de remover el depilatorio con una espátula de madera y agua caliente, colocar una crema sobre la piel depilada y dejar así durante 24 horas; al siguiente día, verificar si el depilatorio no ha producido ninguna reacción local y aprovechar sólo aquellas zonas que no presentaron el más leve trazo de eritema.

Determinación de D M H. — Dosis minima hemolitica, es la menor cantidad de toxina que puede aun hemolizar 0.1 c.c. de uma suspensión de hematíes de carnero a 5% en cuatro horas y a la temperatura de 37°C.

La D M. H es determinada por la técnica de Weinberg y Guillaumie (42), de la siguinte manera:

En una serie de tubos conteniendo volúmenes decrecientes de cultivo centrifugado y diluído, se colocan 0.1 c.c. de una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 5 % y agua fisiológica, de manera a tener un volumen de 1 c.c. en todos los tubos. Se llevan al termoestato a 37° C. Se hacen lecturas frecuentes. Al fin de 4 horas se colocan los tubos a la temperatura del laboratorio y se hace fuertemente el poder hemolitico de las toxinas muy ácidas y no modifica o modifica ligeramente el poder hemolitico de las toxinas cuyo pH es de 6.2 a 6.8 El calentamiento a 100°C durante 30 minutos destruye las hemolisinas de los tipos B y C; después de este calentamiento los cultivos no hemolizan más, aun en la dosis de 1 c.c. Después de 48 horas a 37°C la hemolisina del tipo D pierde casi integramente el poder hemolitico, siendo necesario emplear 0.5 c.c. para hemolizar 0,1 c.c. de glóbulos rojos.
c.c. de glóbulos rojos.

Determinación del poder patogénico. — Cultivar los tipos de *Cl. perfringens* en caldo-higado con fragmentos de hígado durante 24 horas y hacer las inoculaciones por via intramuscular en cobayos de 400 a 450 gramos.

Determinación de D M L. — Se puede usar para esta determinación lauchas de 17 a 20 gramos, por via venosa o palomas por via muscular. Preferimos usar

lauchas, por ser más prácticos y más económicos. Las toxinas son cuidadosamente centrifugadas; las toxinas de los tipos A, B y C, 24 horas después de sembradas, las toxinas del tipo Ov, 48 horas después y la del tipo D, 120 horas después.

El material obtenido por centrifugación es diluido de tal manera que el volumen total no ultrapasará de 0.5 c.c.

Los datos que consignamos más abajo han sido obtenidos por Weinberg y Guillaumie (39).

Tipo A mata a 1/10 ó a 1/20 de c.c.
Tipo B mata a 1/1000 de c.c.
Tipo C mata a 1/1000 ó a 1/2000 de c.c.
Tipo D y Ov mata a 1/10 de c.c.

Preparación de la toxina seca

Es preparada con la técnica descripta al ocuparnos del Suero antiperfringens tipa A.

D M L de la toxina seca. — Los valores medios obtenidos fueron:

Tipo A	0.mgs 06
Tipo B	0.mgs 0009
Tipo C	0.mgs 005 a 0.mgs 007
Tipo D	0.mgs 03
Tipo Ov	0.mgs 04.

Las toxinas deben ser conservadas en los tubos de vidrio ya descripto, tomando las precauciones recomendadas al ocuparnos de las toxinas del Tipo A.

Preparación del holosuero antiperfringens

Un buen holosuero antiperfringens necesita ser antimicrobiano y antitóxico. Para que los resultados terapéuticos sean eficaces, es necesario que el holosuero antiperfringens sea además poliantimicrobiano y poliantitóxico, esto es, será preparado con diversas razas de varios tipos y con todas las toxinas de cada tipo.

Inmunización

El animal de elección es el caballo. La inmunización se inicia con anatoxina filtrada, pasándose a anatoxina solamente centrifugada, más cuerpos micro-

bianos inoculados directamente en la vena o diluidos en anatoxina, y finalmente toxina pura.

Puede inmunizarse los animales con un solo tipo de antígeno. Tiene ventaja sin embargo, en asociar los antigenos, de tal manera que su asociación, tal vez venga a concurrir a una posible sinergia antigénica. Es decir que las asociaciones antigénicas vengan a estimularse recíprocamente.

Sabemos que el organismo animal puede elaborar mediante la solicitación antigénica de un antigeno complexo, numerosos anticuerpos a la vez: es necesario entonces combinar los antigenos de manera que la producción de un anticuerpo dado, no se realice a costa de los demás. Fue verificado que los animales inmunizados con exotoxina B proporcionan sueros con tasa elevada de anticuerpos anti B y anti C y tasas bajas de anticuerpos anti A, anti D y anti Ov. Y que los animales immunizados con toxina D, cuyo suero poseía titulos elevados de anticuerpos anti D y anti Ov, recibiendo toxina B, mostraron formaciones paralelas de anticuerpos anti B y la disminución progesiva de los títulos anti D y anti Ov de suero. Estos hechos demuestran que el antígeno *d* común a las toxinas B y C no existe en cantidad suficiente en la toxina B, sea para hacer aparecer en un animal nuevo gran cantidad de anticuerpos anti D, sea para mantener en tasa elevada el título anti D del suero de un animal inmunizado anteriormente con toxina D.

Un animal inmunizado con muestras de toxinas A y C, produjo un suero con titulo de 100 unidades anti A, en tanto que el titulo anti C, conservó durante 10 meses la tasa media de 1500 unidades. Hecha la hipótesis de la concurrencia de los antigenos, esto es, que la inmunización por el antígeno C perjudicaba la formación de anticuerpos A, fue suspendida la inmunización contra el antigeno C y el titulo A no mejoró, lo que viene a demostrar la falta de reactividad que muchas veces tiene el animal para elaborar cantidades apreciables de anticuerpo A.

Para poder obtener buenos holosueros se puede inmunizar el caballo con mixturas de toxina A, B y D o con mixturas de A, C y D. Los resultados obtenidos con la primera mescla es superior a los obtenidos con la segunda. Las inmunizaciones hechas con las mixturas A y B o A y C no determinaron formaciones de buenos holosueros. En cada inoculación se combinan dosis iguales de antigeno de las tres especies y de cuerpos microbianos, en dosis progresivas, conforme está esquematizado a propósito de sueros antiperfringens tipo A.

Las respuestas antigénicas a este mosaico antigénico es muy variable: los animales receptivos respondem a estos mosaicos bastante mejor. De la *reactividad* de los animales depende el valor de los titulos obtenidos.

Los diferentes anticuerpos no se forman con intensidades iguales. Las antitoxinas B y C se comportan paralelamente; su producción es intensa desde el comienzo de la inmunización como acontece con A. A veces el aumento de los

títulos de uno de los anticuerpos anti A, anti B o anti C coinciden con la disminución de los títulos de los otros.

Obtiénense títulos mejores, cuando se adiciona lanolina a los antígenos. Los cuerpos microbianos son disueltos en 2 a 3 c.c. de toxina centrifugada; la toxina seca es también disuelta en toxina centrifugada y el todo es englobado en lanolina.

Con antígenos lanolinados, Weinberg y Guillaumie, consiguieron obtener sueros convenientes desde la primera inyección. Los títulos obtenidos con estos antígenos, jamás habían sido alcanzados con otros métodos de inmunización. Caballos que no dan sueros por otros procesos, dan así, a veces títulos convenientes

Con gérmens que dan toxinas fuertes, como L D o paludis, bastan pequeñas cantidades de ellos, envuelta en lanolina para conseguir sueros fuertes.

El antígeno C envuelto en gelatina o en gelosa después de la 5ª inyección, da resultados comparables a aquellos obtenidos con lanolina, solamente que el antígeno C en gelatina produce escaras mucho más intensas que cuando se usa lanolina.

Dosificación del holosuero

El holosuero es dosado contra cada una de las toxinas de la especie perfringens

Como este suero no fue todavía patronizado, nosotros aconsejamos dosarlo por los procedimientos siguientes: Los sueros patrones homólogos a cada tipo deben ser preparados de acuerdo con la técnica general de preparación de los Patrónes perfringens ya mencionada.

Valoración del holosuero por vía intracutánea en cobayos albinos de 300 a 400 gramos

Test-dosis intracutáneo (Lr) de toxina, es la menor cantidad de toxina que unida a 1/5 de unidad patrón de antitoxina homóloga produce una zona de lesión cutánea característica en el 2º ó 3º días, circundada por un anillo de eritema bien definido.

Se determina el test-dosis (Lr) de toxina combinando cantidades variables de toxina con 1/5 de unidad patrón de antitoxina homóloga.

Para determinar el test-dosis intracutáneo (Lr) preparar las siguientes diluciones:

1º — 1 c.c. de antitoxina Patrón homologa es diluido en solución salina, de manera que 1 c.c. contiene 2 unidades de antitoxina Patrón homologa ó 0.1 c.c. contiene 1/5 de unidad.

2º — Una cierta cantidad de toxina seca es rigurosamente pesada y disuelta en solución salina con pH 7.0. El volumen debe ser hecho de tal manera que

20 miligramos de toxina estén contenidos en 1 c.c. de dilución. Las mixturas de dilución de toxina perfringens y de antitoxina son hechas en un volumen total de 0.2 c.c. (cantidad a inyectar en los cobayos albinos de 300 a 400 gramos) y deberá contener 1/5 de unidad y cantidades variables de toxina.

Se dejan las mixturas 1 hora a la temperatura ambiente, inyectándose 0.2 c.c. por via intracutánea. Los animales son observados durante 72 horas. Después de 4 horas se comienza a esbozar la reacción. Después de 18 horas es posible hacer una buena lectura.

Dosaje del holosuero de valor desconocido por via intracutanea

Una vez determinada el test-dosis intracutánea operar de la siguiente menera:

a) Preparar las diluciones de holosuero o de los sueros monotípicos anti A, anti B, anti C, anti D y anti Ov.

b) Preparar las diluciones del tes-dosis intracutáneo (Lr):

Pesar rigurosamente la toxina y disolver en solución de cloruro de sodio al 8% hecha con cloruro de sodio previamente fundido y con pH 7. Cada 0.1 c.c. de esta dilución debe contener 1 test-dosis intracutanea.

Las mixturas de las diluciones de suero a dosar con test-dosis de toxina, son hechas de tal manera que estén contenidas en un volumen total de 0.2 c.c. Esta mixtura contiene 0.1 c.c. de suero a dosar más 1 test-dosis.

Aconsejamos para mayor precisión, hacer siempre las diluciones mencionadas en volumen total 10 veces mayores, tomando siempre 0.2 c.c. de la mixtura total.

Las mixturas son dejadas en contacto de 45 a 60 minutos a la temperatura ambiente. La cantidad de 0,2 c.c. es inoculada intracutáneamente en los flancos de cobayos albinos de 300 a 400 gramos, previamente depilados. Los animales son observados durante 48 a 72 horas. Son consideradas positivas, las reacciones que se iniciam 4 horas después de inoculadas y traducidas por una intensa congestión, seguida de una pápula enrojecida que aparece en general 8 horas después. Localmente se forma una zona acintada con zona necrótica central, más frecuentemente al fin de las 48 horas. A su alrededor obsérvase una zona perinecrótica bien definida. Las reacciones menos intensas se observan después de las 72 horas y se traducen por la formación de una zona más pigmentada y descamación.

Es necesario medir el tamaño de las pápulas. El diámetro oscila entre 5 y 40 milimetros. El endurecimiento local es enrojecido, siendo por otra parte muy variable.

Las reacciones son definidas en ligeras, medias y fuertes. La mayor dilución que impide la aparición de lesiones caracteristicas con 1 test-dosis indica el número de unidades que dosa el suero. Generalmente el test-dosis intracutánea representa 1/10 de test-dosis para la laucha.

Como las toxinas B y C, producen lesiones casi enteramente de naturaleza necrótica y como las inyecciones intravenosas de toxinas B y C matan a la laucha rápidamente, debido a la misma toxina beta de las dos, y en cantidades muy pequeñas, siendo a veces imposible sorprender diferencias muy pequeñas en el dosaje de los sueros, pues cantidades infimas de toxina que no fueron neutralizadas son suficientes para matar los animales de prueba, el dosaje por via intracutánea encuentra para el dosaje de las antitoxinas B y C una indicación formal.

Este dosaje por via intracutánea nos proporciona una precisión de 10 % en relación a los dosajes en lauchas por via venosa.

Valoración del holosuero por determinación del titulo antihemolitico

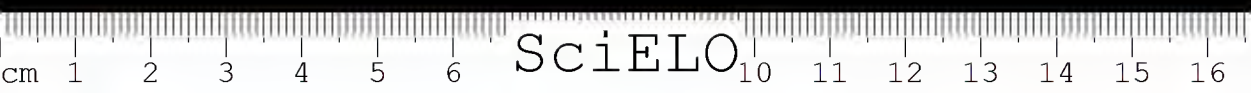
Las toxinas del grupo perfringens pueden ser dosadas con gran éxito por medio de su poder antihemolitico. Existe notable correspondencia entre el titulo antitóxico obtenido *in-vivo* por inyecciones intravenosas en lauchas y el titulo antihemolitico obtenido *in-vitro* conforme demonstraron Masson y Glenny (27).

La hemotoxina Patrón usada para la determinación del título antihemolitico deberá ser seca. La toxina liquida es inestable; para conservarla deberá ser colocada en frascos de vidrio de color ámbar con capacidad de 100 c.c. completamente llenos. Cuando se ha usado, más de 1/3 de la toxina conservada en dichos frascos, debe abandonarse el restante. Esta toxina conservada en volumen pequeño se deteriora muy rápidamente.

En la determinación del test-dosis antihemolitico (Lh) mixtúranse cantidades variables de hemotoxina seca, con una cantidad fija de suero Patrón homólogo, verificando la acción de la lisina residual, no neutralizada sobre los hematies de carnero a 5 %, después de 4 horas de permanencia en el baño maria a 37° C.

Técnica — Test-dosis hemolitica (Lh), es la menor cantidad de toxina que unida a 1/5 de unidad de antitoxina standard homóloga, puede todavia producir hemolisis moderada de 0.1 c.c. de suspensión de hematies de carnero a 5 % en 4 horas y a la temperatura de 37° C.

Para determinar L h es necesario preparar las soluciones siguientes:

1º — 1 c.c. de antitoxina patrón homologa es diluido en solución salina de tal manera que 1 c.c. contendrá 1 unidad de antitoxina Patrón homologa o 0.2 c.c. contendrá 1/5 c.c. de Unidad.

2º — Una cierta cantidad de toxina seca es rigurosamente pesada y disuelta en solución salina con pH 7.0. El volumen debe ser hecho de tal manera que 20 miligramos de toxina estén contenidos en 1 c.c. de dilución. Las mixturas de dilución de toxina perfringens y antitoxina son hechas en un volumen total de 0.9 c.c. (0.2 c.c. de unidad de antitoxina Patrón y cantidades variables de toxina y salina fisiológica con pH 7.0)). Se dejan las mixturas durante 30 minutos a la temperatura ambiente y se adiciona 0.1 c.c. de suspensión de hematies de carnero a 5 % en salina fisiológica. Así tendremos el volumen de 1 c.c en todos los tubos.

Los tubos son colocados después al baño maría por 4 horas, agitando cada 20 minutos y haciendo constante lectura. Se retiran los tubos del baño maría y se hace una nueva lectura, dejándolo a la temperatura ambiente hasta el dia seguiente en que ha de praticarse una nueva lectura definitiva.

Dosando L h de varias toxinas, Glenny halló las siguientes correspondencias:

Lauchas por vía venosa (muertos)	Hemolisis (hematies de conejos)
100 %	Completa o casi completa.
50— 80 %	Parcial.
30— 50 %	Largos trazos.
10 %	Trazos.
0 %	Negativa.

Estas correspondencias son siempre relativamente constantes; a test-dosis animal, definida como la menor cantidad de toxina que mata el 50 % de lauchas inyectadas, corresponde el test-dosis hemolítica que es la menor cantidad de toxina capaz de producir hemolisis moderada. Un test-dosis hemolitica puede extenderse de la zona de hemolisis en largos trazos, hasta la zona de hemolisis parcial.

Dosaje del holosuero de valor desconocido por determinacion del titulo antihemolitico

Una vez determinado L h se opera de la siguiente manera:

a) Preparar diluciones de sueros monotipicos, anti A, anti B, anti C, anti D y anti Ov, o mixturas ya prontas de holosueros perfringens.

b) Preparar la dilución de L h.
Pesar la toxina y disolver en solución salina con ph 7.0. Cada 0.2 c.c. de esta dilución debe contener 1 test-dosis L h.

Las mixturas de las diluciones de suero a dosar con test-dosis (Lh) de toxina son hechas de tal manera que estén contenidas en un volumen total de 0.4 c.c. Adiciónanse 0.5 c.c. de salina elevando asi el volumen total a 0.9 c.c. Se deja en contacto a la temperatura ambiente durante 30 minutos.
La antitoxina combínase con la hemolisina y la neutraliza.

Para la verificación de la hemolisina residual que el suero no fue capaz de neutralizar, se coloca 0.1 c.c. de suspensión de glóbulos rojos de carnero al 0.5%. Tenemos asi un total de 1 c.c. en todos los tubos. Estos son llevalos al baño maria durante 4 horas, siendo agitados frecuentemente y practicando lecturas constantes. Al fin de 4 horas se hace una nueva lectura y se colocan los tubos a la temperatura ambiente hasta la mañana siguiente en que se hace la lectura definitiva.

El método hemolítico proporciona resultados muy aproximados a los obtenidos por el método de las inoculaciones intravenosas en lauchas, principalmente en los dosajes de antitoxinas A, C, D y Ov, porque los filtrados de A, C, D y Ov son fuertemente hemolíticos para los hematies de carnero.

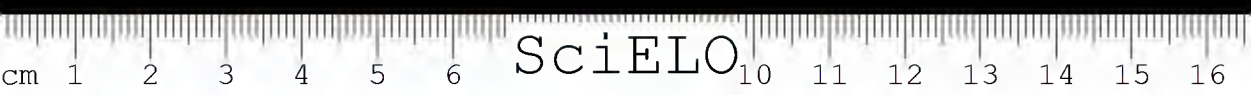
Este método puede ser usado por economia de animales de experiencia y de tiempo en la evaluación de los titulos de sangrías exploradoras de animales de inmunización y las antitoxinas naturales presentes en caballos normales, los cuales cuando más antitoxinas naturales proporcionaren, proporcionarán también mejores titulos en el decorrer de la inmunización.

Dosage del holosuero antiperfringens por el metodo de inyecciones venosas en lauchas blancas

El processo es idéntico al ya descripto a propósito del holosuero antiperfringens tipo A.

Se hace primero, separadamente el dosaje previo de cada suero monotípico, anti A, anti B, anti C y anti Ov y después de mixturadas las diferentes antitoxinas monotípicas, se efectúa el dosaje definitivo del holosuero antiperfríngico.

Cuando usamos el método de dosajes en lauchas por vía intravenosa, debemos considerar lo siguiente: siendo la especie perfringens constituida por varios tipos capaces de producir varios componentes antigénicos que pueden preexistir en un mismo tipo, la capacidad neutralizante de las antitoxinas depende del grado de reactividad del animal que sirvió para la inmunización. Es asi que la ausencia de un anticuerpo dado en una antitoxina no indica necesariamente ausencia del antígeno correspondiente en el filtrado usado para inmunizar el animal. Este antígeno, no obstante, puede faltar, pues una muestra dada puede dejar de producir determinado factor tóxico dependiendo en muchos casos la intensidad de su pro-

ducción de la composición del medio de cultivo. Como más de un factor tóxico concurre para la muerte de la laucha, el resultado de los dosajes depende de la proporción relativa de varias antitoxinas en el suero en relación a las proporciones de los diferentes factores tóxicos presentes en el test-dosis (Lt) de toxina usada.

Los sueros podrán tener sus titulos variables, dependiendo de la riqueza o pobreza de los factores tóxicos neutralizables, homólogos.

El método de dosaje por via intravenosa en lauchas no permite dar indicaciones exactas sobre la propriedad biológica de cada toxina. Así los titulos de los sueros anti C pueden variar con las muestras de toxina empleada, mismo, cuando se usa, como ha hecho Weinberg y Guillaumie (50) D M L muy débiles (0.003 a 0.008 mgs.). Lo mismo ocurre con el suero anti D.

Conforme ya verificamos más atrás, los sueros monotípicos pueden tener acción neutralizante variables, según sus diferentes anticuerpos, reforzando sinérgicamente la acción eficaz del holosuero. Así, el suero anti L D bacillus, neutraliza muy fuertemente las toxinas L D bacillus y paludis y ligeramente las toxinas tipo welchii, Bac. D y ovitoxicus.

El suero anti paludis neutraliza fuertemente las toxinas paludis y Bac. agny debilmente la toxina tipo welchii y anti ovitoxicus, son capaces de neutralizar también las toxinas homólogas Bac. Los sueros anti D y anti ovitoxicus, son capaces de neutralizar tambien cantidades importantes de toxina tipo Welch, siendo poco eficaz contra las toxinas paludis y agni.

El suero antiperfringens tipo Welch no ejerce acción neutralizante sino sobre la toxina tipo Welch.

BIBLIOGRAFIA

1. *Bengston, I. A.* — "Rapport de la Commission Permanente de Standardisation Biologique". C. H. 1056(1):23.1931.
2. *Benneth, H. W.* — "Infections entero-toxaemia (the so-called Braxy-like-disease) of Sheep in Western Australia". Commonwealth Council for Scientific and Industrial Research Bull. 57. 1932.

2a. *Benzoni G.* — "Ricerche biologiche sulla toxina del B. perfringens" — Bol. Inst. Sierot. Mil. 17(2):740.1938.

3. *Borthwick, G. R.* — Ueber die antigenen Eigenschaften der Gifte der zur Gruppe der Welch-Fraenkelschen Gasödem-bazillus gehorenden Mikroorganismen. Z. f. Bact. Orig. 134:89.1935.
4. *Borthwick, G. R.* — "Observations on B. welchii type D; its occurrence in normal animals and the variation in antigenic character of its toxins". — Brit. Jour. Pathol. 18(6):475.1937.
5. *Borthwick, G. R. y Gray, J. D.* — "The type of Cl. welchii in human faeces with special reference to pernicious anaemia". Brit. Jour. Exper. Pathol. 18(18):119.1937.

6. *Bull, G. C. y Pritchett, I. W.* — Identity of toxins of differents strains of B. welchii and factors influencing their production "in vitro". Jour Exper. Med. **26**:867.1917.
7. *Celarek, J. y Setetiewicz S.* — "Contribution a l'étude des hémotoxines de la gangrene gazeuse". C. R. S. Biol. **122**(16):143.1936.
8. *Dalling, T.* — "Lamb dysentery". National Veterinary Ass. Anual Report: 55.1928.
9. *Dalling, T., Glenny, A. T., Mason, J. H. y O'Brien, R. A.* — "The testing and standardization of B. welchii (perfringens) antitoxin". Brit. Jour. Exper. Pathol. **5** (9):48.1928.
10. *De Kruiff, P, Adams, Th. y Ireland, P.* — "The toxins of Bacillus welchii. 1. The production by various strains". Jour. Infect. Dis. **2**:587.1917.
11. *Gaughey, M.* — "The separation from C. wechii of variants which differ intoxicity and antigenic structure". Jour. Pathol. Bact. **36**:263.1933.
12. *Gill, D. A.* — "Pulp-kidney Disease of Lambs (Anacute Entero-toxaemia of Bacterial Origin)". Res Rept New Zeland Dept. of Agricult., Wellington, New Zeland. 1933.
13. *Glenny, A. T., Barr., M., Llewelly-Jones, M. Dalling, T. y Ross, H. E.* — "Multipe toxins produced by some organism of Cl. welchii Group". Jour. Pathol. Bact. **37**: 53.1933.
14. *Glenny A. T., Llewllyn-Jones M., Mason, J. H.* — "The invitro cutaneous method of the testing the toxins and antitoxins of "gas-gangrene" organisms". Jour. Pathol. Bact. **24**:201.1931.
15. *Gortzen, J.* — "Histologische Verandesungen bei kleinnen Versuchstieren nach intravenoser E. inführung des Toxins des Fraenkelzchen Gasbazillus ("B. welchii, B. perfringens")". Centralblat für Bakt. 1. **138**:366.1936.
16. *Henry, H.* — "On composition of B. welchii toxin". Jour. Bact. **26**:497.1922-1928.
17. *Henry, H. y Lacey, M.* — "The precipitation of Bac. welchii toxin". Jour. Patho. Bact. **23**:273.1920.
18. *Kendall, A. I. y Smitt, F. O.* — "The ocurrenee of a physiologically active substance in cultures of the gas bacillus". Proc. Soc. Exp. Bact. and Med. **24**:104.1926.
19. *Humphreys, F.* — "Formation of acrolein from glycerol by B. welchii". Jour. Infect. Dis. **35**:3.1924.
20. *Jensen, C.* — "Rapport sur les étalons biologiques internationaux conservés au Statens Serum Institut de Copenhague pour le compte de l'Organisation d'Hygiene de la Societé des Nations". Bul. Trimestrel de Org. Hygiene **5**:790.1936.
21. *Klose* — "Ueber Toxin und antitoxin versuche mit den Fraenkelschen Gasbrand-bazillus". Müchen. med. Wochens: **723**, 10 Maio 1916.
22. *Kojima, K.* — "Ueber Chemismus des Toxinbildung durch den B. phlegmonis emphys. Frakel". Bioch. In. **128**:519.1922.
23. *Mac Ewen, A. D.* — "B. paludis: A new species of pathogenic Anaerobic Bacterium". Jour. Comparative Pathol. Therapeutics, **43**:1.1930.
24. *Mason, J. H. y Glenny, A. I.* — "The "in vitro" titration of B. welchii antitoxin by its. nati-haemolytic power". Jour. Pathol Bact. **31**(4):629.1928.
25. *Medical Research Committee* — "Reports of the Committe upon Anaerobic Bacteria and Infections. Report on the Anaerobic Infections of wounds and the Bacteriological and Serological Problems arising there from". Special Report. Series n. 39.1919.
26. Memorandum on the Standard for gas gangrene antitoxin (perfringens) and its aplication — Permanent Commission on Biological Standartisation — League of Nations — C. 11.C. P. S.|23 Geneve 1935.

27. *Nicholson, J. A.* — "Some observations on the physiological action of Clostridium welchii toxins" — University of Cambridge. Institute of Animal Pathology. Fourth Report: 212.1934-1935.

28. *Orr, J. H. — Campbell, W. A., Reed, G. B.* — "A comparison of the action of Clostridium welchii toxin with other haemotoxins on human and rabbit red cels "in vitro". Canadian Jour. Researche, 2:91.1930.

29. *Oxer.* — "Pulp-kidney or acute infections enterotoxaemia of sucking lambs due to B. ovitoxicus". Commonwealth of Australia. Council of Scient and Industr. Research. 35:20.1932.

30. *Prausnitz, C.* — "Memorandum sur la standardization Internacional des Sérums et des Produits Bactériens". Commission Permanente de Standartization des sérums, des reactions sérologiques et des produits biologiques. Org. Hyg. Soc. Nations C. 11 832:9.1929.

31. *Prigge, R.* — "Ueber Wirksamkeit und Antitoxingehalt des Gasbrandserums". Deut. Med. Wochensc. 63(51):1906.1937.

32. *Rosenau, M. J.* — "The immunity unit for standartizing diphtheria antitoxin". Hyg. Lab. Bulletin 21:53.1912.

33. *Simmonds, J.* — "Studies in B. welchii with special reference to classification and to its relation to diarrhea". Mongr. Rockfeller Inst. for Med. Res. 5(27):9.1915.

34. *Souto, A. B. y Lima, C.* — "Action de la vitamine C (acide L-ascorbique) sur la toxine du Bacillus perfringens". C. R. S. Biol. 129(24):76.1938.

35. *Souto, A. Lima C.* — "Ação da vitamina C. (acido 1-ascorbico sobre as toxinas da gangrena gasosa". Brasil Medico 52(26):593.1938.

36. *Sordelli, A. — Asúa, J. F. y Ferrari, J.* — "Medicion del suero anti-perfringens (B. welchii)". Rev. Inst. Bact. (B. Aires) 5(5):555.1929.

37. *Von Wassermann* — "Veroff a. d. Gebiete d. Militar—Sanitatsverw H.". 68. K 18 apud Walbum L. E. e Reymann. Jour. Pathol. Bact. 36:470.1933.

38. Vorschriften für die staatliche Prüfung der Gasbrand (perfringens) — Sera—Ministeriolblatt d. Reichsund Preuss Ministerums des Innern. n.° 15:591.1937.

39. *Walbum L. E.* — "The importance of hydrogen ion concentration in hoemolysis by the lysins of anaerobic bacteries". Journ. Pathol. and Bact. 46:85.1938.

40. *Walbum, L. E. y Reymann, G. C.* — "The production of toxins by Cl. welchii. Jour. Pathol. Bact. 36:469.1933.

41. *Weinberg, M., Davesne, J., Prevot, A. K.* — "Recherches sur la standardization des Serums antigangreneux". Ann. Inst. Pasteur 49:(4):387.1932.

42. *Weinberg, M. y Guillaumie, M.* — "Recherches sur antigenes de l'espece perfringens" Rev. Immunologie 2(6):513.1936.

43. *Weinberg, M. y Guillaumie, M.* — "Titres aparents et titres reels des serums antitoxiques". C. R. S. Biol. 123(31):661.1936.

44. *Weinberg, M. y Guillaumie, M.* — "Holosérum anti-perfringens". Rev. Immunologie 3 (6):485.1937.

45. *Weinberg, M. y Guillaumie, M.* — "Nouvelles recherches sur la production de sérums specifiques par des injections d'antigene englobe dans la lanoline. Serums anti-Bacillus L. D., anti-Bacillus paludis et anti-Bacillus D." C. R. S. Biol. 120(38) 937.1935.

46. *Weinberg, M. y Guillaumie, M.* — "Obtention rapide avec des antigenes englobés dans la lanoline de serums antigangreneux de titre antitoxique trés elevée." C. R. S Biol. 124(6):518.1937.

47. *Weinberg, M. y Guillaumie, M.* — "Réceptivité du cheval aux différents antigénes de l'espece perfringens. Holoserum anti-perfringens". C. R. S. Biol. 125(23):982.1937

48. *Weinberg, M. y Guillaumie, M.* — "Nouvelles recherches sur la titrage des sérums anti-perfringens". C. R. S. Biol. 126(30):656.1937.

49. *Weinberg, M. y Guillaumie, M.* — "Titrage des sérums antitoxiques". C. R. Acad. Sc. 204(12):1012.1937.

50. *Weinberg, M. y Guillaumie, M.* — "Titrage des Sérums antigangreneux (anti-perfringens C, anti-perfringens D, anti-histolytique et anti-Vibrion septique)". C. R. S. Biol. 127(12):1084.1938.

51. *Weinberg, M. y Nasta* — "Role des hemolysines dans intoxication microbienne". Ann. Inst. Pasteur 34:690.1920.

52. *Weinberg, M., Nativelle, R. y Prevot, A.* — "Les microbes anaerobies". Masson y Cia. Paris, 1937.

53 *Weinberg, M. y Prevot, A. R.* — "De l'employe des anatoxines pour la preparation des serums antigangreneux". C. R. Acad. Sc. 179:227.1924.

54. *Weinberg, M. y Prevot, A. R.* — "Nouvelles recherches sur les anatoxines gangreneuses dans la vaccination du cobaye et le preparation des serums spécifiques." C. R. S. Biol. 92:1484.1925.

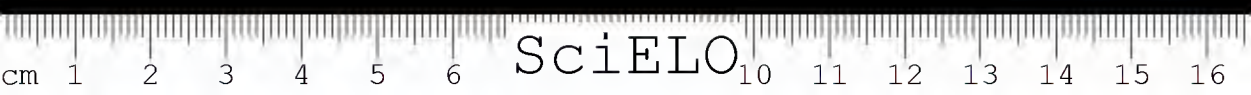
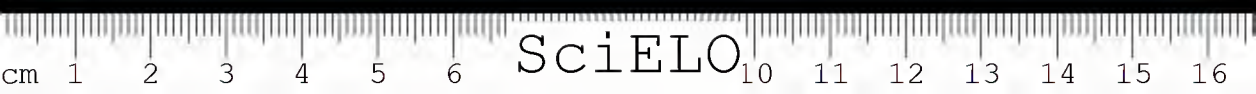
55. *Weinberg, M. y Seguin P.* — "La gangrene gazeuse". Masson & Cia., Paris. 1919.

56. *Wilsdon, A. J.* — "Observations on the classification of Bacillus welchii". Univ. Cambridge. Inst. Animal Pathology. — Second Report: 55.1931.

57 *Wilsdon, A. J.* — "The relationship of "Bacillus ovitoxicus" (Bennetts) to the Clostridium welchii group". Univ. Cambridge. Inst. Animal Pathology, Third Report: 46.1932-1933.

58. *Wuth, O.* — "Serologische un biochemische Studien uber das Hamolysin des Fraenkelschen Gasbrandbacillus". — Bioch. Zeit. 142:19.1923.

59. *Weinberg, M. y Guillaumie, M.* — "Determination du titre antitoxique des sérums anti-perfringens A, C et D". Revue d'Immunologie 5(1):5.1939

615.37:616.245

PREPARACIÓN DEL SUERO ANTIGANGRENOSO

II. Preparación del suero antioedematis-maligni

POR

ARIOSTO BÜLLER SOUTO y JUAN B. RIVAROLA

Jefe de la Sección de Anaerobios del Instituto Butantan (Brasil)

Jefe del Laboratorio de Seroterapia de la Sanidad Militar (Paraguay)

INTRODUCCIÓN

Los trabajos iniciales sobre la toxina del *Clostridium oedematis-maligni* (vibrion septique), fueron realizados por Roux y Chamberland (13). Pero la propiedad del *Clostridium oedematis-maligni* (v. septique) de producir exotoxina genuina termolabil, fue señalada por primera vez en 1901 por Leclainele y Morel (6) haciendo crecer este anaerobio durante 5 días en caldo Martin glucosado.

En 1915, Raphael y Frasey (12) prepararon su toxina de la manera siguiente: las muestras conservadas en caldo yema de huevo, eran repicadas en caldo Martin glucosado al 2 % ; la cultura hija era pasada en caldo Martin no glucosado. La cultura neta obtenida servía para sembrar un balón de caldo glucosado al 2 %. Después de 24 horas de incubación, el caldo era centrifugado y filtrado en vela. El filtrado mataba regularmente el conejo de 2 kilos en la dosis de 0.5 c.c. a 1 c.c. La toxina así obtenida era muy inestable y se atenuaba rápidamente mismo man tenida en la heladera.

Nicolle, Césare y Raphael (8) usaron también el caldo Martin glucosado a 2 %. La cultura era también filtrada, pero sólo despues de haber sido incubada al termostato durante 5 a 15 días. Las toxinas así obtenidas, eran muy atenuadas, tal vez debido a la incubación muy prolongada que causa un debilitamiento muy considerable de la toxina .

Weinberg y Seguin (20) incubando de 36 a 40 horas, obteniam mejores toxinas. Experimentaron numerosas medios habiéndoles proporcionado mejores resultados el caldo Martin glucosado a 0.5 o/oo, desejado envejecer varias semanas a la temparatura del laboratorio.

Según British Medical Research Committee (7) Miss Muriel Robertson, preparaba toxina vibrión séptico de título muy elevado, usando caldo simple o glucosado con pH 7.8 a 8.0 sembrado con fragmentos de hígado de cobayo muerto por infección a vibrión séptico.

Ficker (3) adicionando carbonato de calcio para neutralizar los ácidos formados, consiguió obtener toxinas muy fuertes, con D M L para la laucha 0.005 c.c.

Wuth (22) adicionando también carbonato de calcio al caldo glucosado, obtuvo el máximo de producción de toxina entre 9 a 11 días, pudiendo ya en 24 horas, demontrar la presencia de toxina. Este autor demostró que la toxina era destruída en 20 minutos a 70° C y que se atenuaba a la temperatura ambiente, siendo muy sensible a la acción de la luz y del aire.

Karube (4) hizo un estudio comparativo sobre los diferentes medios; los mejores resultados fueron obtenidos con medio V F y medio con carne de ternera, que da toxina mortal para la laucha en la dosis de 0.005 c.c.; con tenor elevado en glucosa aumentaba el poder tóxico de la toxina.

La adición de cisteina acelera la producción de la toxina y retarda su atenuación espontánea. El medio sin glucosa no produce toxina; después de 7 horas la toxina ya está presente, y con 16 a 20 horas llega a su concentración máxima, después de 48 horas comienza a atenuarse, desapareciendo enteramente al fin de 14 días. Las mejores peptonas fueron la Chapoteaut y Witte; ambas dan lugar a la producción de gran cantidad de hemolisina. Los medios de cultura con pH 7,6 ó 7,8, fueron los que producían cantidades mayores de toxina vibrión séptico.

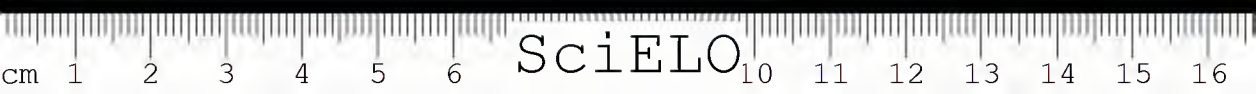
Según Karube la toxina se conserva mejor con pH entre 5 y 6.0.

I. — Preparación de la toxina

Cepa

Según Robertson (14) existen por lo menos 3 tipos serológicos demostrables por la aglutinación. Tanto las muestras antiguas, como las muestras recientemente aisladas, cuando son toxigénicas, dan buenas toxinas.

Debe usarse una o varias muestras, buenas productoras de toxina. Los pasajes por cobayos pueden aumentar bastante el poder toxigeno. Para esto se inocula 0.5 c.c. de uma cultura en el músculo de la pierna y cuando el cobayo estuviere agonizante, se sacrifica y se retira un fragmento de hígado que se siembra directamente en los balones de cultivo o en tubos de Tarozzi con suero; los cultivos destinados a la producción de toxina deben ser siempre muy jóvenes, por esta razón conviene repicarlos frecuentemente.

Posemos en el Instituto Butantan 20 cepas para la preparación de suero anti oedematis-maligni (vibrión séptico).

Medios de cultivo

A). — Medical Research Committee (7) aconseja caldo simple o glucosado con pH 7.8 a 8.0.

B). — Walbum y Reymann (16) obtienen buenas toxinas con el siguiente medio:

1º — Caldo de ternera común conteniendo 1 % de peptona.

2º — Antes de autoclavar ajustar a pH 8.0 y distribuir en frascos de 1 litro a 1 litro y medio; después de esterilizado el pH se conserva a 7,6 — 7,8.

3º — Antes de sembrar agregar glucosa (solución a 50 %) a 1 % y 20 a 30 grs. de carbonato de calcio estéril.

4º — Expulsar el aire por calentamiento durante 2 horas, hirviendo en baño maría con agitación regular; adicionar 200 c.c. de parafina líquida estéril y continuar el calentamiento durante 30 minutos.

Los medios preparados con peptona Riedel, Proteosa-peptona Difco y peptona Martin dan buenas toxinas.

La estabilidad máxima de las toxinas fueron obtenidas a pH 6.5.

C.) — Weinberg, Nativelle, y Prevot (17) obtuvieron los mejores resultados con el conocido medio de V F.

D.) — Bengtson (2) usa caldo Martin y 2 % de suero de caballo estéril.

E.) — Nosotros aconsejamos el medio descripto a propósito de la preparación de sueros perfringens, glucosado a 1 %.

Condiciones que favorecen la producción de toxina

a) — La agitación una vez al día; la agitación excesiva oxida la toxina.
b) — La adición de cloruro de calcio que impide que el pH baje de 6,5.
c) — La adición de carne cocida, de suero normal de caballo y de hígado.
d) — La adición de cisteina.

Condiciones que atenuan la toxina

a) — La permanencia en la estufa, por más de 48 horas.
b) — La presencia de O en el medio por falta de calentamiento previo.
c) — La acción directa de la luz solar sobre el medio, aun antes de sembrado.

d) — La permanencia muy prolongada del medio de cultivo en la estufa o a la temperatura ambiente.
e) — El envejecimiento de la toxina, aun a baja temperatura.
f) — La acidez del medio. La toxina de *Clostridium oedematis-maligni* se conserva bien con pH 6,5.
g) — La filtración.
h) — El pasaje de burbujas de aire, de oxígeno o de hidrógeno.

Condiciones que no influyen en la produccion de toxina

La concentración de peptona.

Siembra

El medio, una vez retirado del autoclave es enfriado a 40° C. Será sembrado de preferencia con un fragmento de higado de cobayo inoculado el día anterior con cultura bien virulenta de vibrión séptico y sacrificado en el momento de la siembra. Si hubiese necessidad de hacer repiques directos, las culturas deberán ser conservadas en medios de igual composición al caldo de toxina y los repiques serán repetidos cada 12 horas. Cada 1000 c.c. de medio será repicado con 20 c.c. de cultura joven.

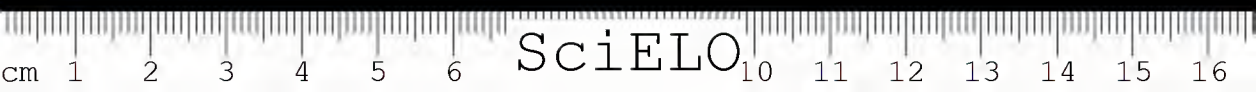
Periodo de incubación

Las exigencias anaeróbicas del vibrión séptico le colocan entre el *Clostridium welchii* y el *Clostridium oedematiens.*

Obtiénese un crecimiento abundante en un medio recubierto con una capa de parafina liquida, 1 a 2 c.c. en la superficie. El máximo de producción de toxina es obtenida con 36 a 40 horas de incubación a 37° C.

Obtención de la toxina

Para los fines de inmunización la toxina debe ser centrifugada hasta la obtención de un liquido límpido.

La toxina del vibrión séptico no consigue siempre atravesar las velas Chamberland. Ciertas velas dejan pasar totalmente o casi totalmente. De aqui la necesidad de comenzar la inmunización con toxinas filtradas y terminar con toxinas centrifugadas. Usar los métodos nefelométricos a fin de precisar el grado de turbidez de la toxina y su consecuente riqueza en gérmenes.

Acción de la toxina

Produce un edema extenso de coloración rojo fuerte y una considerable cantidad de gas en deredor de los músculos y tejidos invalidos por el proceso de gangrena gaseosa.

Pasternack y Bengtson (10) verificaron que la toxina del vibrión séptico actuaba casi sin período de incubación, dependiendo la rapidez de su acción tóxica, exclusivamente de la dosis inoculada, al contrario de otras toxinas que necesitan, sea cual fuere la dosis inoculada, un cierto período de incubación para producir su acción tóxica. Además verificaron que un aumento insignificante en dosis no tóxicas es suficiente para tornarlas mortales.

"Lautenschlager, however, as the result of this experiments, reached the conclusion that the toxic dose for rabbits followed the "all or none", i. é, the smallest amount of toxin which was fatal reacted as quickly and potently as a considerably larger fatal dose. An amount slightly smaller than the minimal lethal dose had no effect".

Esta ley explica, porqué es a veces tan difícil determinar el test-dosis vibrión séptico y hacer el dosage del suero respectivo, una vez que se exige, por definición 50 % de muertes en el primer caso y 50 % de protección en los dosages de suero. Minima cantidad de toxina residual no neutralizada es suficiente para producir 100 % de mortalidad.

Acción sobre el aparato circulatorio — La inoculación de toxina de vibrión séptico produce una rápida elevación y después un descenso brusco de la presión arterial acompañada de una arritmia cardiaca. El corazón es directamente atacado por la toxina, quedando esta acción sin efecto seccionando los neumogástricos. La acción de la toxina vibrión séptico es idéntica a la acción de la digital sobre el músculo cardíaco.

Acción sobre la sangre. — El poder hemolítico del vibrión séptico es muy pronunciado. La acción hemolítica se manifiesta sobre los glóbulos rojos del cobayo, conejo, carnero, caballo y humano. Los hematies del conejo y el cobayo son aglutinados por las toxinas del vibrión séptico. Según Walbum la estabilidad óptima de la hemolisina se obtiene con pH 5. 0.

Sintomatologia.

El periodo de incubación no existe o es muy corto, variando de algunos segundos a 60 minutos.

Despuées de la inoculación de la toxina vibrión séptico, las lauchas presentam una serie de movimientos violentos y convulsivos. Giran sobre si mismo, hasta que sobreviene la muerte. La muerte no demora mucho en virtud de

la acción que ejerce la toxina vibrión séptico sobre el organismo del animal de experiencia como vimos más arriba.

Necropsia.

La toxina del vibrión séptico no produce lesiones características. En trabajos recientes Pasternack y Bengston (10) estudiaron la acción de la toxina del vibrión séptico sobre lauchas, cobayos, conejos y palomas.

En los músculos de cobayos inoculados, se observan intensa coloración roja; el hígado, y la cápsula suparenal presentan una coloración menos intensa, a veces hay ruptura de estómago.

En lauchas, animales usados por nosotros para dosages de toxina y suero el corazón presenta la musculatura muy blanda; microscópicamente los capilares y vasos cardíacos están regularment llenos de sangre. Nótase hemorragias intersticiales de grado variables. Estas lesiones cardíacas son de tamaño y grado tambiém variables. En general estas variaciones dependen de la dosis y duración del processo tóxico. Areas proeminentes de degeneración hialina de Zenker pueden constatarse en los animales que sobrevivem más de 30 minutos. En algunos casos grandes extensiones de músculo cardíaco normal están presentes. En otras áreas, grupos de músculos y de fibras aparecen palidos. En estas fibras las extriaciones trasversales están generalmente suprimidas. Los núcleos quedan normales. La necrosis hialina de Zenker es la degeneración paranquimatosa más común, siendo más frecuente en los ventrículos. No se encuentra regeneración del músculo cardíaco.

Los riñones se hallan igualmente afectados, aumentados de volumen e intensamente congestionados y rojos. Animales que sobreviven por algún tiempo, muestran hemorragias en el tejido capsular y perirenal. En riñón es irregularmente moscado por un puntillado hemorrágico intercalado por áreas amarillentas de necrosis. Este cuadro es más evidente cuando se secciona la cápsula. Seccionado el riñon se verifica el aumento de tamaño del cortex y los glomerulos como minúsculos puntos rojos en la palidez del cortex. En la conjunción del cortex con la médula se notan muchas veces una zona hemorrágica. La zona medular está intensamente congestionada y frecuentemente muestra pequeñas hemorragias.

Al examen microscópico el riñón de las lauchas inoculadas con toxina de vibrión séptico muestra degeneración tubular, principalmente de los tubos de Henle y de los tubos colectores; con todo la necrosis del epitelio cesa repentinamente en la conjunción del cortex con la médula.

Prácticamente todas las lauchas muestran alteraciones degenerativas de los tubos. Estas varían en intensidad y son de distribuición irregular. Nótase degeneración glomerular y hemorragias difusas y focales peri, intra y subcapsulares

Los vasos de la región medular están muy distendidos. Se ha visto con frecuencia trombonecrosis de vasos de calibre medio y de capilares.

El Bazo esá distendido y friable. Las lesiones sólo pueden ser bien caracterizadas cuando las lauchas inoculadas con la toxina de vibrión séptico viven más de 7 horas. Nóta-se congestión de los senos y de la pulpa, grados variables de extravasación hemorrágica en la pulpa con modificación de su arquitectura; picnosis nuclear y cariolexis de los linfocitos foliculares de la pulpa y fagocitosis de los restos celulares por las células del reticulo; degeneración nuclear y fragmentación de las células linfoides de los corpúsculos de Malpighi.

Prácticamente los animales muestran considerable cantidad de pigmento sanguineo en el bazo. Este pigmento puede ser visto libre en la pulpa o en las márgenes del corpúsculo de Malpighi y fagocitado en cantidad variable por las células del reticulo y por los macrófagos libres de la pulpa y de los espacios libres vasculares.

El hígado, en general está ingurgitado por sangre. Este ingurgitamiento se verifica principalmente en las sinuosidades de las venas centrales. En las áreas necróticas se constatan algunos trombos hialinos. Las células hepáticas aparecen frecuentemente entumecidas, este entumecimiento es tan grande que puede llegar a obliterar los sinusoides. Las células hepáticas son hialinizadas, generalmente intensamente eosinofilicas, mostrando picnosis nuclear marcada o moderada. El pigmento sanguineo puede ser encontrado o en la célula hepática o en la célula de Kupffer.

Los pulmones permanecen generalmente normales; a veces presenta zonas de congéstion o edema y extravasación hemorrágica. Las cápsulas suprarenales están generalmente normales.

Determinación de D M L.

Esta determinación se realiza usando lauchas blancas de 17 a 20 gramos, inoculadas por via venosa.

La D M L es en general 24 veces menor que 1 L-t.

Preparación de la toxina seca.

Se prepara de acuerdo a la técnica empleada para la preparación de la toxina seca del *Cl. perfringens.*

Determinación de D M L de la toxina seca.

Diluir la toxina seca en solución salina fisiológica o caldo con pH 7.0 e inocular lauchas de 17 a 20 gramos por via venosa en un volumen total de 0.5 c.c.

Sólo aprovecharmos para toxina Patrón en los dosages de suero las que tengan gran poder toxigeno. Las más débiles usamos para immunización.

II. — Preparación del suero antiodematis-maligni (vibrión séptico).

Inmunización

El animal de elección para la preparación del suero antivibrión séptico, es el caballo. Es necessario seguir el curso de la inmunización con todo cuidado, verificando siempre los cuadros de peso y de temperatura. Si el peso cayera visiblemente, se debe espaciar las inoculaciones, asimismo cuando las reacciones térmicas son fuertes.

Los caballos pueden morir con dosis tóxicas ligeramente "super limiares", en virtud de la ley del "todo o nada" estudiada por Lautenschlager.

Oms (9) refiere algunos casos de fracasso de la inmunización de animales en grado avanzado de inmunización. Nosotros hemos advertido también la necessidad de que los animales sujetos a la preparación de suero antivibrión séptico, sean mantenidos permanentemente a la vista de los encargados de este servicio, hasta el final, en virtud de accidentes desagradables que ya hemos presenciado por falta de esos cuidados.

La inmunización se inicia con anatoxina y suero gangrenoso polivalente (sólo en la primera dosis), pasándose despuées a anatoxina centrifugada, más cuerpos microbianos, inoculados directamente en la vena o mixturado con anatoxina. Alcanzado a 300 c.c. de anatoxina se practica la sangria de prueba. Si el suero del animal presentare antitoxina circulante, se podrá pasar directamente a la inoculación de la toxina pura o associada a cuerpos microbianos. Las toxinas usadas para estas inoculaciones deberán ser frescas y nunca toxinas conservadas.

Nosotros jamás empleamos para la inmunización toxinas con más de 48 horas, esto es, sólo empleamos con tiempo justo para esperar el dosage subsiguente y poder constatar si la toxina a usarse, tiene poder tóxico.

A los antígenos específicos associamos, a veces, ciertos antigenos inespecificos, tales como la tapioca, el cloruro de calcio o lanolina. Numerosos de nuestros animales fueron inmunizados con anaculturas. La adición de cuerpos microbianos, permite obtener sueros, al mismo tiempo antitóxicos y antimicrobianos que poseen poder antitóxico y antiinfeccioso más acentuado que los sueros antitóxicos y antimicrobianos solamente.

La via de inoculación será subcutánea.

Preparación de los cuerpos microbianos.

1.º — Centrifugar las culturas.

2.º — Diluir el depósito de centrifugación en 10% de solución salina, en relación al volumen centrifugado; por ejemplo, si se ha centrifugado 4 litros, se diluirá en 400 c.c. de salina.

3.º — Agregar formol al 4%º, en proporción a la cultura centrifugada.

4.º — Agitar vigorosamente.

5.º — Llevar a la estufa durante 4 días a 37º C.

6.º — Verificar esterilidad para aerobios y anaerobios.

7.º — Lavar los cuerpos microbianos en agua fisiológica, dos veces seguida, centrifugando cada vez y renovando la solución fisiológica.

8.º — Recoger el depósito en placa de Petri con el mínimo posible de líquido.

9.º — Secar al vacío sulfúrico.

10.º — Triturar en mortero.

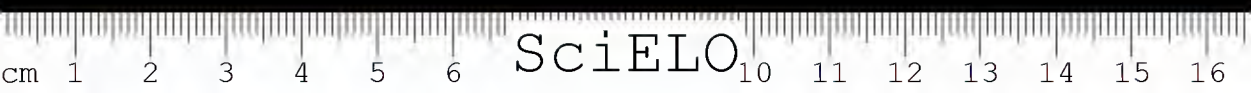
11.º — Pesar la cantidad total obtenida a fin de hacer la proporción entre la toxina bruta y la cantidad de cuerpos microbianos.

Importante. — También aquí, como en el caso del *Cl. perfringens*, el grado de dilución de los cuerpos microbianos tiene mucha importancia. Emulsiones poco voluminosas y muy densas provocan abcesos. Diluciones muy voluminosas dan lugar a placas de induración en el punto de inoculación y a veces grandes abcesos que puedem perjudicar las inoculaciones subsiguientes. Es pues necesario usar volúmenes medios. Dosis de 50 a 100 ó 150 c.c. deberán ser inoculados de acuerdo al peso de microbios a inocular.

Preparación de anacultura.

Es preparada de acuerdo a la técnica de Weinberg y Prevot (18).

Las anaculturas exigen más tiempo que las anatoxinas para que se tornem atóxicas. Como la toxina de vibrión séptico es muy sensible a la accion del formol, pudiendo perder integramente su poder antigénico, cuando la acción del formol es demasiado intensa o muy prolongada, es necessario tratar separadamente la toxina y los gérmenes. El formol es adicionado a los cultivos a 5/1000 y conservados a 37º C durante 8 días.

Control. — 10 a 20 c.c. de esta anacultura inoculada al cobayo no debe producir sino tumefacción ligera.

Preparación de anatoxina.

La toxina del vibrión séptico es muy sensible a la acción destrutiva del formol. Se prepara la anatoxina siguiendo da técnica de Weinberg y Prevot (19). La adición de formol torna la toxina del vibrión séptico completamente atóxica mantenida en la estufa durante 48 horas a 37° C.

Control. — Una dosis de 3 a 5 c.c. de anatoxina no debe provocar ninguna reacción inflamatória en el cobayo, ni producir trazos de hemolisis.

III. — Dosificación del suero anti-oedematis-maligni

En 1931 el Comité Permanente de Standardización Biológica de la Liga des Naciones (5) recomendó estudiar la posibilidad de adoptar una unidad antitóxica internacional antigangrenosa (oedematis-maligni) basado sobre el mismo principio seguido para la antitoxina perfringens. En 1935, Hartley y White (5) propusieron un nuevo Patrón antitóxico internacional para la antitoxina oedematis-maligni (vibrión séptico) que fue aceptado.

Naturaleza del Patrón

La unidad antiodematis-maligni internacional es definida como la actividad antitóxica específica ejercida por 0.2377 mgs. de preparación seca y estable de suero antiodematis-maligni del National Institute for Medical Research de Hampstead. Por sugestión del Prof. Martin fue especificado que 1 unidad neutraliza una cantidad correspondiente de cerca de 24 dosis mortales para la laucha de la toxina empleada en das experiencias de determinación. Esta unidad es exactamente mitad de la unidad propuesta por MacCoy y casi el doble de la unidad propuesta por Weinberg, Davesne y Prevot. Una unidad francesa es la mitad de la unidad internacional y un cuarto de la unidad MacCoy.

Preparación del suero Patrón.

El suero Patrón es preparado de sangre de un caballo inmunizado contra los cuerpos microbianos y toxina de *Cl. oedematis-maligni*. El suero antiodematis-maligni, para ser usado como patrón, debe tener un titulo elevado. El suero natural (sin antiséptico de ninguna especie) es reducido a estado seco por los medios comunes hasta peso constante y conservado en ampollas al abrigo de la luz y a la temperatura de 4° C.

Uso del Patrón

El suero Patrón de acuerdo con Therapeutique Substances Act (1925) debe ser disuelto en solución glicerinada (glicerina 2 partes, solución salina 1 parte).

El poder antitóxico de los sueros antiodematis-maligni en unidades internacionales es determinado por inyecciones en animales (lauchas blancas, cobayos) de una mixtura de la antitoxina en prueba con la toxina oedematis-maligni, patrón que fue standardizada en relación al suero Patrón antioedematis-maligni.

Animales usados.

Se usan en las determinaciones por vía venosa, lauchas blancas de 17 a 20 gramos. En los dosages por vía intracutánea se emplean cobayos albinos de 300 a 400 gramos.

Toxina Patrón para los dosages.

Para los dosages de los sueros antioedematis-maligni (vibrión séptico) es necessario standardizar las toxinas oedematis-maligni (vibrión séptico) en relación al suero Patrón antioedematis-maligni (vibrión séptico).

Determinación del test-dosis (L t) de toxina Patrón.

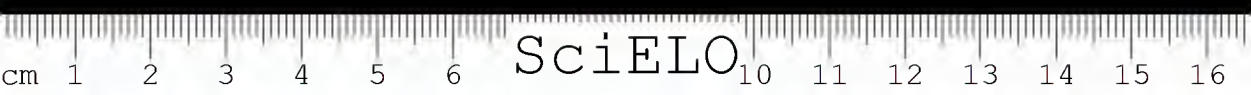
La determinación del test-dosis (L t) de toxina Patrón puede efetuarse por dos métodos:

I). — Por inyección intravenosa en lauchas blancas de 17 a 20 gramos.

II). — Por inyección intracutánea en cobayos albinos rasurados en los flancos o depilados y cuyo peso ha de ser de 350 a 400 gramos.

I). — Por inyección intravenosa en lauchas blancas:

Definición. — Test-Dosis (L t) de toxina oedematis-maligni (vibrión séptico) es la cantidad de toxina Patrón que unida con 1 unidad de antitoxina Patrón mata algunos, mas no todos los animales inoculados.

Para determinar el test-dosis (L t) de toxina oedematis-maligni (vibrión séptico) se prepara las diluciones siguientes:

a). — 1 c.c. de antitoxina Patrón es diluída de tal manera que 1 c.c. contenga 5 unidades antitóxicas.

b). — Una cierta cantidad de toxina oedematis-maligni (vibrión séptico) e cuidadosamente pesada y disuelta en solución salina fisiológica con pH 7.0. El volumen final debe ser completado de tal manera que 1 c.c. de la solución de toxina contenga 20 miligramos.

c). — Las mixturas de cada una de las diluciones de antitoxina Patrón son hechas en un volumen total de 0.5 c.c. (cantidad a ser inoculada intravenosamente en cada laucha) la que deberá contener 0.2 c.c. de antitoxina diluída (1 Unidad) más cantidades variables de la solución de toxina.

Las mixturas son dejadas a la temperatura ambiente durante 1 hora, siendo inyectadas intravenosamente la cantidad de 0.5 c.c., a grupos de 6 lauchas. Las lauchas deben ser elegidas de un stock de animales de peso uniforme, esto es de 17 a 20 gramos. Las lauchas inoculadas serán observadas durante 3 días, precisando conservarlas a temperatura constante. La mayoría de los animales mueren en las primeras 24 horas, ocurriendo muy raras muertes con 72 horas.

El test-dosis, contienne en general 24 D M L.

Cuando la dosis de toxina es muy elevada todos los animales mueren. Cuando las dosis están próximas al test-dosis (L t), algunos animales mueren, otros quedan enfermos y tristes y otros sobreviven.

En la determinación del test-dosis de toxina oedematis-maligni (vibrión séptico) raramente tuvimos la proporción de 50% de muertes. En general encontramos proporciones aproximadas o alejadas (1/6, 2/6, 5/6).

Dosage de antitoxina de gangrena gaseosa oedematis-maligni (vibrion septico) de valor desconocido

(Dosages previos).

Preparar las diluciones siguientes:

a). — Dilución el suero en prueba.

b). — Preparar la dilución de toxina Patrón.

La toxina es rigorosamente pesada y disuelta en solución salina fisiológica, de manera que 1 test-dosis este contenido en 0.2 c.c.

Las mixturas de las diluciones del suero a dosar con el test-dosis son hechas en volumen total de 0.5 c.c. en tubos especiales, el que debe contener cantida

des variables del suero a dosar diluído, más 0.2 c.c. de test-dosis y más la cantidad necesaria de solución salina para completar el volumen total de 0.5 c.c.

Esta solución salina servirá para lavar el tubo, después de haber retirado la mixtura suero-toxina.

Las diluciones antes de inoculadas son dejadas durante 1 hora a la temperatura ambiente.

La dosis total de 0.5 c.c., es inoculada intravenosamente a 4 lauchas blancas de 17 a 20 gramos mantenidas a temperatura constante.

Aconsejamos usar siempre pipetas certificadas para hacer las diluciones.

Para las inoculaciones serán empleadas jeringas metálicas de 1 c.c. divididas en centécimos y munidas de agujas de platino; una seringa para cada serie de diluciones. Las lauchas inoculadas serán observadas durante 72 horas.

Testigos. — Cada dosage será acompañado de su testigo. Sin este requisito los dosages no tendrán valor. Los testigos serán inoculados con una mixtura de 1 unidad de suero patrón antiodematis-maligni (vibrión séptico), más 1 test-dosis y cantidades mínimas de toxina, superiores e inferiores a este test-dosis.

Estos testigos son imprescindibles a fin de constatar si la cantidad de toxina empleada como test-dosis ha sido exacta o si hubo variación en más o en menos.

El porcentaje de animales sobrevivientes indica la protección aproximada conferida por el suero en prueba.

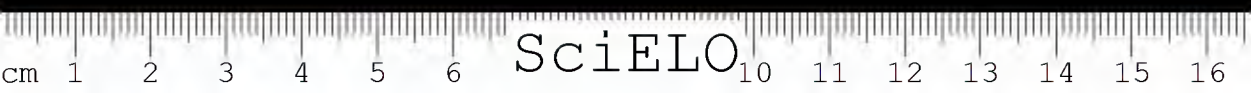
Dosages definitivos.

La técnica a seguir es la misma que la empleada en los ensayos previos, sólo que en estos casos el número de animales de experiencia debe ser aumentado a 10 ó 12 para cada dosis.

II) Por inyección intracutánea en cobayos de 300 a 400 gramos.

La toxina y antitoxina de vibrión séptico pueden ser medidas con apreciable precisión por inyección intracutánea. Hartley y White (5) hallan este método, simple, conveniente y económico, pudiendo prorporcionar resultados comparables a los obtenidos por el método de inyécción intravenoso en lauchas.

La toxina líquida, no obstante más estable que la toxina del *Cl. perfringens* se deteriora tornandose inutil como toxina test.

La toxina a ser usada debe por tanto ser seca. En estas condiciones conserva su poder tóxico por lo menos tres años.

Primero debe verificarse el aspecto de la reacción producida en la piel del cobayo. Prepáranse concentraciones variables de toxina en un volumen invariable de 0.2 c.c. Usualmente dosis de 0.5 mgs. producen lesiones necróticas muy extensas. y 0.025 mgs. no produce reacción. Deben inocularse dosis intermedias entre 0.5 mgs. y 0.025 mgs. debiendo cada observador conceptúé más conveniente para inocular y a distancia conveniente entre ellas.

Lo cobayos albinos de 300 a 40 son los mejores; en cada flanco puede hacerse 5 inyecciones. Las lecturas son hechas a las 24 horas, y la lectura final a las 48 horas.

Para determinar el test-dosis intracutáneo preparar las siguientes diluciones:

a). — La antitoxina es diluída de tal manera que 1 c.c. contenga 5 unidades.

b). — Una cierta cantidad de toxina seca es rigurosamente pesada y disuelta en solución salina con pH 7.0 El volumen debe ser completado de tal manera que 1 c.c. contenga 30 mgs. de toxina.

Hacer una serie de mixturas de toxina de antitoxina en volumen total de 2 c.c., 5 unidades son mixturadas con cantidades variables de toxina. Las mixturas son dejadas durante 1 hora a la temperatura ambiente; retirase 0.2 c.c. de cada mixtura e inyéctase por vía intracutánea; cada losis inyectada, por tanto, contiene 0.5 unidades de antitoxina, más la cantidad total de 0.1 de toxina contenida en los 2 c.c. de mixtura. Se determina así Lr, esto es la cantidad contenida, en los 2 c.c. de mixtura. Se determina así $\frac{Lr}{2}$. esto es la cantidad de toxina que unida a media unidad de antitoxina e inyectada intracutáneamente produce una reacción pequeña pero característica en la piel del cobayo.

Los resultados obtenidos por Ssilanowa (15) muestran que el método intracutáneo, por sus resultados concordantes con aquellos obtenidos en lauchas. puede servir perfectamente como método auxiliar para el dosage de los sueros antiodematis maligni (vibrión séptico).

....

a). — DETERMINACIÓN DE LR (1)

Sol. de antitoxina	Cantidad	Mixtura preparada Volumen 2. c. c.		Dosis inyectada	Resultado después de 24 horas
		Toxina	Antitox.		
	c. c.	Mgs.			
	0,9	27			Reac. severa. Necrosis.
ANTITOXINA PATRÓN INTERNACIONAL.	0,85	25,5	1. c. c. = 5 unidades	0,2 c. c.	Reac. poco int. Necrosis.
	0,8	24			Reac. moderada. Necrosis
	0,75	22,5			Reac. debil.
	0,70	21			Ausencia reac.
	0,65	19,5			Ausencia reac.

b). — VERIFICACIÓN DE LR

Solución de antitoxina	Mixtura preparada Volumen 2 c. c.			Volúmen de mixtura inyectada	Resultado después de 48 horas
	Toxina	Antitoxina			
		c. c.	Unidades		
	Mgs.				
		0.90	4.50		R. severa. Necrosis
ANTITOXINA PATRÓN INTERNACIONAL.	24	0.95	4.75	0.2 c. c.	R. severa. Necrosis
		1.00	5.00		Reac. moderada
		1,05	5.25		Reac. débil
		1,10	5.50		Ausencia de Reac

C. — DOSAGE DE ANTITOXINA OEDEMATIS-MALIGNI (VIBRION SÉPTICO) DE VALOR DESCONHECIDO

Toxina 24 mgs. en 1 cc.	Antitoxina Dil. 1/20 c. c.	Salina c. c.	Volúmen de mixtura inyectada intramuscular	Cantidades inyectadas		Resultado después de 48 horas
				Toxina Mgs.	Antitoxina c. c.	
0.5	0.555	0.645	0.2 c. c.	2,4	0.00278	R. severa. Necrosis
0.5	0.585	0.615	0.2 c. c.	2,4	0.00293	R. severa. Necrosis
0.5	0.625	0.575	0.2 c. c.	2,4	0.00313	R. moderada
0.5	0.675	0.525	0.2 c. c.	2,4	0.00338	R. débil
0.5	0.715	0.486	0.2 c. c.	2,4	0.00357	Ausencia Reacción
	5. Unid. en 1 cc.	0.	0.2 c. c.	2,4	0.5 Unid.	Reac. moderda

1) Del trabajo de Bengtson (2) tomamos algunos ejemplos de dosage por via intracutánea.

BIBLIOGRAFIA

1. *Bengtson, I. A.* — "Studies on the standardisation of V. septique antitoxin". Public Health Rep. 49:251.1934.
2. *Bengtson, I. A.* — "The Official United States and International Unit for Standardizing gas gangrene antitoxin (Vibrion septique)". Public Health Rep. 49(52): 1557.1934.
3. *Ficker, M.* — "Ueber ein Toxin des aus Gasbrandfallen isolierten Bacillus oedematis-maligni". Med. Klin. Ber. 13:1181.1917.
4. *Karube, H.* — "Studien ueber Toxin von Vibrion septique". Japan Jour. Exper. Med. 12:151.1934.
5. *Hartley, P. y White, P. B.* — "A proposed international standard for gas gangrene antitoxin (Vibrion septique)". Quarterly Bull. Health Organisation League Nations — Special Number — Biological Standardisation — Extract A: 1.1935.
6. *Leclainche, E. y Morel, C.* — "La sérothérapie de la septicémie gangreneuse". Ann. Inst. Pasteur 15:1.1901.
7. Medical Research Committe. — "Reports of the Committe upon Anaerobic Bacteria and infections. Report on the Anaerobic Infections of wounds and Bacteriological and Serological Problems arising therefrom". Special Report Series n.° 39.1919.
8. *Nicolle, M.; Césare, y Raphael, A.* — "Etude sur le Vibrion septique et le "Bacterium chauvoei". Ann. Inst. Pasteur 29:165.1915.
9. *Oms, F. V.* — "Preparación del suero antigangrenoso". Editor Morata — Madrid. 1929.
10. *Pasternack, J. C. y Begtson, I. A.* — "The experimental pathology and pathology histology produced by the toxin of Vibrion septique in animals". National Inst. Health Bull. 168.1936.
11. Rapport de la Commission Permanente de Standardization Biologique". C H 1056 Londres 23 Juin, 1931.
12. *Raphael, A. y Frasey, V.* — "Toxine du Vibrion septique et antitoxine correspondente". C. R. Acad. Sc. 161:361.1915.
13. *Roux y Chamberland* — "Inmunité contre la septicémie conferée par des substances solubles". Ann. Inst. Pasteur 1:561.1887.
14. *Robertson, M.* — "Serological groupings of Vibrion septique and their relation to the production of toxin". Jour. Pathol. Bact. 23:153.1919-1920.
15. *Ssilanowa, J. W.* — "Zur nitrakutanen Wertbstimmung der Gasodematoxine und Gasodemsera (Anti-perfringens, anti-histolytikus und anti-vibrion-septique) und Kaninchen. Centralblatl, fur Bakt. I. 133:149.1935.
16. *Walbum, L. E. y Reymann, G. C.* — "The production of toxin by Bacillus oedematis-maligni (Vibrion septique), Jour. Pathol. Bact. 42(2):351.1936.
17. *Weinberg, M.; Nativelle, R. y Prevot, A.* — "Les microbes anaerobies". Masson & Cie. Paris, 1937.
18. *Weinberg, M. y Prevot, A.* — "De l'emploie des anatoxines pour la preparation des serums antigangreneux". C. R. Acad. Sc. 179:227.1924.

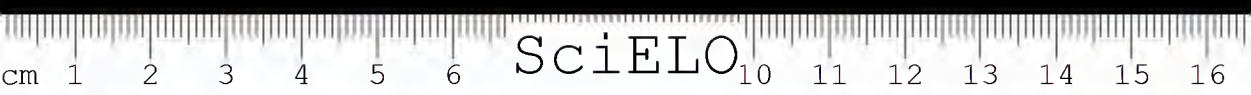
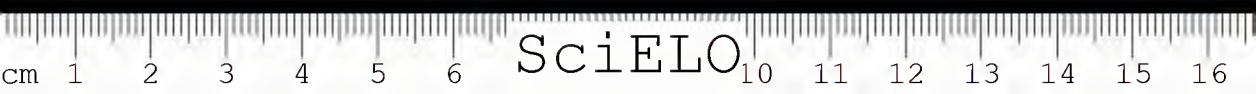
19. *Weinberg, M. y Prevot, A.* — "Nouvelles recherches sur les anatoxines gangreneuses, leur emploi dans la vaccination du cobaye et la preparation des serums specifiques". C. R. Soc. Biol. 92:1484.1925.

20. *Weinberg, M. y Seguin, P.* — "Quelques documents sur la preparation de la toxine et de l'antitoxine du Vibrion-septique". C. R. Soc. Biol. 80:715.1917.

21. *Witte, J. y Schaaf, J.* — "Veber die speciizitat und therapeutische Wirkung von Gasodemserum" Zentral, für Bakteriol. Or. 87:122.1931.

22. *Wuth, O.* — "Bioch. Ztschr. 93, 289, 1919 apud Walbum e Reymann". Jour. Path. Bact. 42(2):351.1936.

4

615.37:616.245

PREPARACIÓN DEL SUERO ANTIGANGRENOSO

III. Preparación del suero antioedematiens

POR

ARIOSTO BÜLLER SOUTO y JUAN B. RIVAROLA

Jefe de la Sección de Anaerobios del Instituto Butantan (Brasil)

Jefe del Laboratorio de Seroterapia de la Sanidad Militar (Paraguay)

INTRODUCCIÓN

El *Clostridium oedematiens* fué descripto durante la guerra europea, de 1914 a 1919 por Weinberg y Seguin (13) que llegaron a demonstrar su capacidad de producir exotoxina específica termolabil, incubando de 1 a 6 días a 37° C. en caldo glucosado a 2/1000.

Estos autores, definieron con precisión, las propiedades de la toxina y pudieron preparar sueros altamente antitóxicos por inmunización en caballos.

Las toxinas obtenidas inicialmente fueron débiles, matando los cobayos en 12 a 17 en dilución a 1/40, inoculados en la vena. Estas toxinas, aun a dosis muy altas, jamás mataban los cobayos en forma fulminante, necessitando siempre un período de incubación para producir su acción tóxica.

Más tarde consiguieron toxinas más fuertes que mataba las lauchas blancas en dosis de 1/800 a 1/1600 en 48 horas por inoculación subcutánea (14).

El Medical Research Committe en 1919, (5) aconsejaba para la producción de toxina el mismo medio empleado para la preparación de toxina de Cl. welchii (B. perfringens). La toxina así obtenida mataba los animales de laboratorio por inoculación intravenosa, subcutánea o intramuscular. Esta toxina podía ser fácilmente titulada por la inyección intramuscular en lauchas, tomando en cuentas los resultados después de 48 horas.

En 1928, Sordelli, Ferrari y Mayer (8) usando un caldo básico con pH 8,4, adicionado de 5% de gelatina, conteniendo carne cocida en el fondo e incubado durante 6 a 8 días a 37° C. conseguieron una toxina con D M L de 0,1 a 0.005 para cobayos de 250 gramos inoculados por vía intramuscular, los que moriam 3 o 5 dias despuécs.

Celareck y Stetkiewicz (2) encontraron que en caldo hígado y el caldo común conteniendo carne cocida en el fondo con pH 7,6 y recubierto con parafina líquida constituía un excelente medio para la obtención de toxina de Cl. oedematiens.

I. — Preparación de la toxina

Cepas

La obtención de buenas muestras productoras de toxina oedematiens no es un problema simple. Una vez obtenida pueden peder bruscamente su capacidad toxigênica. Este hecho pudo ser verificado por nosotros con varias de nuestras cepas. Pasajes de las muestras destinadas a la producción de toxina, por una serie de lauchas blancas, exalta la virulencia. La siembra puede ser hecha directamente con pequeños fragmentos de músculo extraído de lauchas inoculadas. Es mejor repicarlas frecuentemente en tubos de Hall conteniendo fragmentos de hígado en el fondo del caldo, que ha de ser de igual composición que aquel que servirá para la producción de toxina.

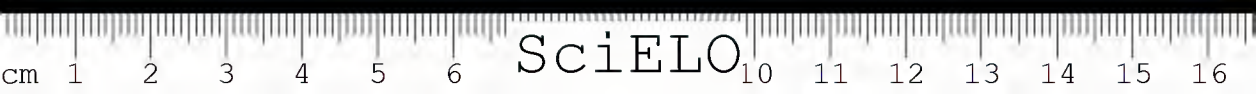
Bengtson (1) notó que el Cl. oedematiens, bajo este aspecto, difere del Cl. oedematis-maligni (vibrion séptico) que se comporta muy uniformemente en la producción de toxina; todas las muestras producen toxina de valor aproximado. De 16 amuestras de Cl. oedematiens por ella estudiadas, 4 no producian toxina; 2 nuestras producian toxina fatal para la laucha en la dosis de 0.1 c.c.; 4 producían toxina con DML de 0.01, y 2 con D M L de 0.001 c.c. o menos.

Medios de cultivo

A.) — Sordelli, Ferrari y Mayer (8) aconsejan el siguiente medio:

1.º — Carne 1 parte y agua 2 partes es dejada en maceración una noche a la temperatura ambiente. Al día siguiente calentar a ebullición durante 30 minutos.
2.º — Filtrar. — Adicionar 5|1000 de cloruro de sodio y 2% de peptona Bacteriológica Park-Davis.
3.º — Ajustar el pH a 8,4 — Precipitar.
4.º — Adicionar 5% de gelatina.
5.º — Esterilizar a 100° C durante 1 hora y a 110° C durante 15 minutos.
6.º — Alcalinizar nuevamente a 8,4 después de la esterilización.

B.) — Walbum y Reymann (10) aconsejan el siguiente medio:

1.º — Caldo común de ternera fermentado por el Coli durante 20 horas a 37° C.
2.º — Calentar al baño maría.
3.º — Filtrar en papel.

4.º — Adicionar 3% de peptona Riedel previamente disuelta.
5.º — Ajustar el pH a 8.0 Distribuir en frascos con 1000 c.c. en cada uno.
6.º — Recubrir con parafina liquida.
7.º — Esterilizar. Conservar en la heladera después de las pruebas de esterilidad.

Antes de sembrar calentar hasta ebullición durante 1 hora y adicionar 20 gramos de carbonato de calcio y calentar otra hora más hasta ebullición.

C.) — Bengtson (1) usa un medio, constituido por 1|4 de caldo básico y 3|4 de caldo común com pH 8,4 distribuido en balones de Erlemeyer de 2 a 4 litros esterilizados en autoclave a 121° C durante 30 minutos. Después de esterilizado la reacción cae a pH 7.0. Antes de usar, los balones son calentados durante 1|2 hora a vapor fluente y enfriados a 40° C adicionándole 5% de suero normal de caballo.

D.) — Nosotros obtenemos buenas toxinas empleando el medio descripto con motivo de la preparación del suero antiperfringens, haciendo la preparación por maceración con Coli a 37° C. durante 24 horas y aumentando la tasa de peptona hasta 2 y 3%.

Condiciones que favorecen la producción de toxina.

1.º — La adición de trozos de hígado produce toxinas con titulos más elevados, que la adición de trozos de músculos en el fondo del balón, tal vez, porque con hígado el *Cl. oedematiens* encuentra mayor facilidad en fabricar nidos de anaerobiosis que tanto auxilia la producción de toxinas fuertes.
2.º — La agitación suave que difunde en todo el medio de cultivo el peroxido formado, evitando que llegado a cierta concentración se destruya la toxina formada o que mueran los gérmenes en los nidos de anaerobiosis.
3.º — La adición de gelatina.
4.º — La adición de carbonato de sodio.
5.º — La adición de suero.
6.º — La adición de cloruro o de sulfato férrico.
7.º — La ausencia de glucosa.

Condiciones que atenuan la producción de toxina.

1.º — La falta de regeneración del medio; la regeneración deberá ser siempre en exceso.
2.º — La presencia de glucosa en los medios de cultivo.

3.º — La oxidación. La toxina liquida deberá ser conservada en frascos color ámbar y completamente llenos. En caso contrario será conservada protegida por una capa de toluol.

4.º — El envejecimiento atenúa la toxina con gran rapidez.

5.º — La acción de la luz solar sobre el medio de cultivo, aun antes de la siembra.

6.º — La caída del pH. La toxina a fin de ser conservada deberá tener el pH ajustado entre 6, 5 y 7.0.

Siembra.

El medio debe ser regenerado con exceso a fin de expulsar completamente el aire, pues el Cl. oedematiens es muy sensible a pequeños trazos de Oxígeno.

El calentamiento debe ser prolongado durante 1 hora en baño maría y por 1|2 hora a vapor fluente.

Oms (7) consigue una siembra buena enfriando la parte inferior del balón hasta una temperatura que sea tolerada por la mano; sembrando el germen en el fondo del balón las capas líquidas más altas conservan una temperatura más elevada que hacia abajo asegurando una anaerobiosis más perfecta.

Las muestras serán siempre conservadas en tubos de Hall, con medios de igual composición al que va a servir para preparar la toxina. Las siembras serán hechas con 20 c.c. de cultura de 24 horas. Se puede igualmente sembrar el medio, con un fragmento de músculo de laucha inoculada con *Cl. oedematiens* algunas horas antes.

Periodo de incubación.

Lo mejor es adoptar, para los fines de un buen crecimiento del Cl. oedematiens, todos los medios de anaerobiosis que tengamos a mano.

Después de la siembra, estando el medio aun caliente, será puesto dentro de grandes secadores Hempel, o en campánulas de vacio dentro de la estufa en comunicación directa con una bomba de vacio, retirando el aire muy lentamente a fin de evitar el burbujamiento del medio o la mojadura de los tapones que podría contaminar los balones. Diariamente será retirado el aire del desecador. Ademais de esto debe procurar hacerse una agitación suave durante todo el período de incubación. Hacemos la filtración del 5.º al 6.º dias de incubación a 37º C.

Obtención de la toxina.

Puede obtenerse por filtrado y por centrifugación. La toxina del *Cl. oedematiens* cuando es obtenida de buenas muestras, es siempre una toxina fuerte. Para la inmunización y preparación de nuestros sueros antitóxicos-antimicrobianos, preferimos inicialmente en todos los casos, usar toxinas obtenidas por filtración, asociadas a cuerpos microbianos secos, muertos previamente por el Lugol, en vez de usar las toxinas obtenidas por centrifugación. Las toxinas centrifugadas son usadas sólo cuando son perfectamente limpidas.

Acción de la toxina.

La toxina de *Cl. oedematiens* necesita un periodo más o menos largo de latencia para producir su acción.

Sobre el aparato circulatorio su acción se manifiesta por un aumento de la presión arterial y al comienzo, aumento del número de latidos cardiacos. En el periodo final disminuyen los latidos cardiacos. La toxina mata por detención del corazón.

Sobre la sangre. — Ciertas muestras de *Cl. oedematiens* secretan hemolisinas. La cultura total destruye *in-vitro* los hematíes humanos, de carnero y de cobayo. Entre tanto esta acción, bien que constante, es mucho más débil que la acción hemotóxica de *Cl. perfringens* y de *Cl. oedematis-maligni*. Ciertas muestras ovinas tienen un poder hemolítico muy elevado. Según Walbum (10) la hemolisina del *Clostridum oedematiens* se conserva mejor con pH 6.0.

Sobre el aparato respiratorio. — Produce un aumento del número de excursiones respiratorias, con disminución de la amplitud de las mismas. En los periodos finales produce disnea.

Sintomatologia

Según Humpreys (4) el animal inoculado con toxina de *Cl. oedematiens* presenta siempre un cierto periodo de latencia. Este periodo de incubación, varía de 6 a 18 horas, durante el cual no se notan ningún síntoma, no siendo un edema local. Después de este periodo de incubación, los pelos del animal se erizan, el ritmo respiratorio se acelera, los flancos se escaran y el animal se enfria gradualmente apareciendo convulsiones. Cuando se usan cobayos, además de estos síntomas, estos animales lanzan pequeños gritos. La muerte sobreviene rápidamente con síntomas de intoxicación grave. La disnea y sobre todo la hipotermia constituyen señales precursoras de muerte próxima.

Necropsia.

La toxina de *Cl. oedematiens* produce como carácter distintivo un edema gelatinoso incoloro que llega a tomar tanto el músculo como el tejido subcutáneo. Este edema no produce crepitación gaseosa y se diferencia fundamentalmente del edema producido por la toxina de *Cl. oedematis maligni* (v. séptico) que es intensamente rojo y da crepitación gaseosa.Si la infección evoluciona rápidamente, el edema toma a veces una coloración rosada.

La inoculación intramuscular de la toxina en el músculo de la pata de la laucha produce un aumento del volumen del miembro inoculado. La pata se torna fría, la piel pálida y azulada. Un edema poco depresible invade la pared abdominal y va hasta afuera. Por la incisión se constata la presencia de un edema gelatinoso franco incoloro o de coloración rosada.

No hay necrosis del tejido atacado y la lesión no tiene olor fétido.

Nótase zonas de necrosis en el hígado, bazo y riñón. Hiperemia de los intestinos y cápsulas suprarenales.

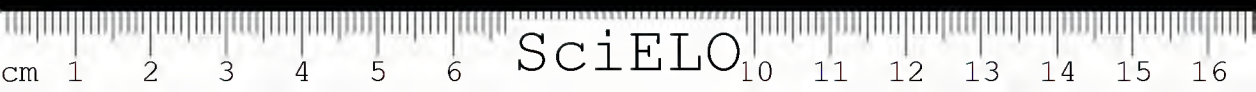
Determinación de D M L.

Esta determinación se hace en lauchas blancas por inoculación intramuscular. La D M L es en general 28 veces menos que *Test-dosis.*

Preparación de la toxina seca.

Se prepara usando la técnica descripta a propósito de la preparación de la toxina de *Cl. welchii.* Es necesario precipitar la toxina en una atmósfera con nitrógeno, debido a la combinación del sulfato de amonio con el oxigeno del aire. El medio gelatinoso de Sordelli no sirve para la preparación de la toxina seca.

Determinación de la D M L de la toxina seca.

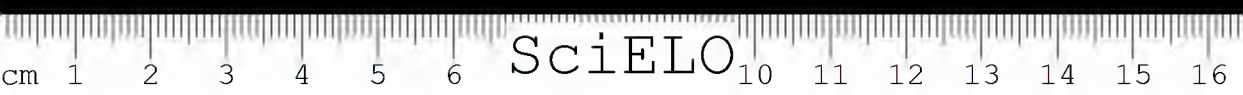
Diluir la toxina en solución salina o caldo con pH 7.0 (el caldo peptonado ejerce acción protectora contra la oxidación de las toxinas y asi obtenemos valores más elevados), e inocular en lauchas por vía intramuscular. Solamente aprovechamos las toxinas secas muy fuertes para toxina Patrón. Las toxinas débiles son aprovechadas para inmunización.

II. — Preparación del suero antioedematiens.

Inmunización

El animal de elección para la preparación del suero antioedematiens es el caballo. La preparación del suero antioedematiens exige, más que ningún otro, excepcionales cuidados en lo que respecta a la vida de los animales empleados para la inmunización. El caballo es muy sensible a la acción de esta toxina. La inoculación de débiles dosis deter mina la aparición de edemas locales y edemas a distancia, que desaparecen a solamente después de varias semanas. El caballo presenta además de síntomas locales graves, fiebre, disnea y pérdida de apetito que muchas veces hace temer por su existencia.

La inmunización se inicia con el suero atigangrenoso polivalente y anatoxina, pasándose después a anatoxina pura, más cuerpos microbianos, inoculados con mixturas de anatoxina directamente en la vena. Alcanzado a 300 c.c. de anatoxina se practica la sangria de prueba; si el suero del animal presenta ya alguna antitoxina circulante se podrá pasar directamente a toxina pura o asociada a cuerpos microbianos. Las toxinas usadas podrán ser secas, como se usa actualmente en el Instituto Butantan o toxinas brutas recientemente preparadas conservadas con toluol y pH 6. 5 e, 7. A los antígenos especificos asociamos ciertos antígenos inespecíficos tales como la tapioca, el cloruro de calcio o lanolina. Algunos animales fueron inmunizados con éxito por medio de anaculturas.

Preparación de los cuerpos microbianos.

1. — Centrifugar las culturas.
2. — Diluir el depósito de centrifugación en 10% de solución salina en relación al volumen centrifugado. Por ejemplo si se ha centrifugado 4 litros, se diluira en 400 c.c. de salina.
3. — Agregar formol al 4 por mil en proporción a la cultura centrifugada.
4. — Agitar vigorosamente.
5. — Llevar a la estufa durante 4 dias a 37° C.
6. — Verificar esterilidad para anaerobios y aerobios.
7. — Lavar los cuerpos microbianos en agua fisiológica, dos veces seguida, centriiugando cada vez renovando la solución fisiológica.
8. — Recoger el depósito en placa de Petri con el minimo posible de liquido.
9. — Desecar al vacuo sulfúrico.
10. — Triturar en mortero.
11. — Pesar la cantidad total obtenida a fin de hacer la proporción entre la toxina bruta y la cantidad de cuerpos microbianos.

Importante. — El grado de diución tiene mucha importancia. Emulsiones poco voluminosas y muy densas provocan abcesos. Diluciones muy voluminosas dan lugar a placas de induramiento en el punto de inoculación y a veces grandes abcesos que pueden perjudicar las inoculaciones siguientes. Es pues necesario usar volúmenes medios. Dosis de 50, 100, 150 c.c. que deberían ser inoculados conforme al peso del germen a inocular.

Preparación de la anacultura.

Es preparada de acuerdo a la técnica de Weinberg y Prevot (12). Las culturas de *Cl. oedematiens* exigen 7 dias de estufa a 37° C con formol al 3/1000 para transformarlas en anaculturas.

CONTROL. — Esta anacultura inoculada en la dosis de 10 a 20 c.c. a un cobayo, no debe producir sino tumefacción ligera.

Preparación de la anatoxina.

Se transforma la toxina de *Cl. oedematiens* en anatoxina adicionándole formol de 1.5 a 3 por mil y dejando 7 a 8 dias en la estufa a 37° C.

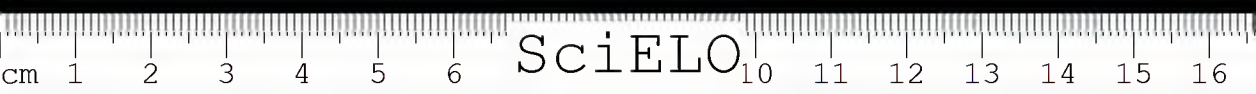
Esta toxina puede ser purificada por el sulfato de amonio y dializada. Inoculada por vía intravenosa produce un voluminoso exudado seroso de la cavidad pericárdica; no produce sin emargo el edema gelatinoso subcutáneo que es característico de *Cl. oedematiens.*

Control. — Una dosis de 3 a 5 c.c. de anatoxina no debe producir reacción inflamatoria en el cobayo.

III. — Dosificación del suero antioedematiens.

En 1932 el Comité Permanente de Standardización Biológica de la Liga de las Naciones reunido en Copenhague decidió que el State Serum Institute de Copenhague estableciese una nueva unidad antigangrenosa (oedematiens) basado sobre los mismos principios seguidos para la antitoxina perfringens.

Naturaleza del Patrón.

La unidad antioedematiens internacional es definida como la actividad antitóxica específica ejercida por 0.2681 mgs. de la preparación seca y estable de suero antioedematiens. Por sugestión del Profesor Martins fue especificado

que 1 unidad neutraliza una cantidad correspondiente de cerca de 1.400 D M L para la laucha, de la toxina usada en las experiencias de determinación. Una unidad internacional corresponde a 10 unidades francesas y a 50 unidades alemanas. Una unidad francesa corresponde a 5 unidades alemanas y a 0.1 unidad internacional.

Preparación del Patrón.

El suero Patrón es preparado de suero de caballo inmunizado contra cuerpos microbianos y toxina de *Cl. oedematiens*. El suero antioedematiens para ser usado como Patrón debe tener un título elevado. El suero natural (sin adición de antisépticos) es distribuido rigurosamente por medio de pipetas aforadas o de aparatos apropriados, en ampollas en la cantidad de 5 c.c. Las ampollas son colocadas en desecadores con cloruro de calcio y ligado al vacuo, hasta que el contenido dé la apariencia de estar seco. Esto se consigue en 2 ó 3 días, siendo necesario durante estos días cambiar varias veces el cloruro de calcio contenido en el desecador. Colócase entonces las ampollas en otra serie de desecadores conteniendo anhídrido pentafosfórico. Se dejan allí estas ampollas durante 2 meses hasta conseguir que se torne completamente seca. Una que otra vez han de ser retiradas de estos desecadores y pesadas. Cuando se ha alcanzado un peso constante deben ser llenadas con nitrógeno, cerradas, y conservadas en la obscuridad, a 4° C.

Uso del Patrón.

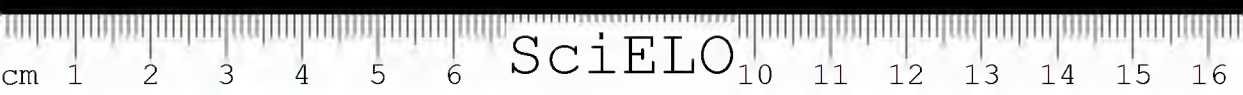
El suero Patrón de acuerdo con Therapeutique Substances Act (1925) debe ser disuelto en solución glicerinada (glicerina neutra 2 partes, solución salina con pH 7.0 una parte).

El poder antitóxico de los sueros antioedematiens es determinado por inyección en animales sensibles de una mixtura de la antitoxina oedematiens en prueba con la toxina oedematiens Patrón que fue standardizada en relación al suero patrón antioedematiens.

Animales usados.

Se usan para estas determinaciones, por vía muscular, lauchas blancas de 17 a 20 gramos.

Toxina Patrón para los dosages.

Para el dosage del suero antioedematiens es necesario standardizar las toxinas oedematiens en relación al suero Patrón antioedematiens.

Determinación del test-dosis (L t) de toxina Patrón.

Definición. — Test-dosis de toxina oedematiens es la cantidad de toxina las que mixturada con 0.02 unidad antitóxica Patrón mata algunas, pero no todas las lauchas inoculadas (cerca de 50 %).

Para determinar el test-dosis de toxina oedematiens preparar las siguientes diluciones:

a). — 1 c.c. de antitoxina patrón es diluida de tal manera que 1 c.c. contenga 0.2 unidad antitóxica.

b). — Una cierta cantidad de toxina oedematiens es cuidadosamente pesada y disuelta en solución salina fisiológica con pH 7.0. El volumen final debe ser completado de tal manera que 1 c.c. de solución contenga 50 mgs de toxina.

c). — Las mixturas de cada una de las diluciones de antitoxina patrón son hechas en un volumen total de 0.2 c.c. (cantidad a ser inyectada en el músculo de la laucha) el cual deberá contener 0.1 c.c. de antitoxina diluída (0.02 unidades) más cantidades variables de solución de toxina.

Las mixturas son dejadas a la temperatura ambiente durante 1 hora, siendo inyectadas por vía muscular (0.2 c.c.) en grupos de 6 lauchas. Las lauchas deben pertenecer a un stock uniforme y tener un peso también uniforme de 17 a 20 gramos. Los animales inoculados serán observados durante tres días, debiendo mantenérselos en un cuarto con temperatura constante.

Un L t contiene en general 28 D M L de toxina.

Dosage de antitoxina oedematiens de valor desconocido

(Dosages previos)

Preparar las diluciones siguientes:

a). — Dilución de suero en prueba.

b). — Preparar las diluciones de toxina Patrón. La toxina es rigurosamente pesada y disuelta en solución salina de manera que 1 test-dosis este contenido en 0.1 c.c.

Las mixturas de las diluciones de suero a dosar con el test-dosis son hechas en un volumen total de 0.2 c.c. en tubos especiales. Estos contienen cantidades variables de suero a dosar líquido, más 0.1 c.c. de test-dosis y más la cantidad necesaria de toxina para completar el volumen total de 0.2 c.c.

Las diluciones son dejadas durante 1 hora a la temperatura ambiente. La dosis total de 0.2 c.c. es inoculada intramuscularmente en 4 lauchas blancas de 17 a 20 gramos mantenidos a temperatura constante.

Aconsejamos usar jeringas metálicas de 0.25 c.c. divididas en centécimos, debiendo emplearse una jeringa para cada serie de diluciones a fin de evitar que quede retenido mucho líquido de cada dilución en el pabellón de la jeringa o en la aguja.

Testigos. — Cada dosage será acompañado siempre de su testigo. Sin estos testigos el dosage no tendrá valor. Los testigos serán inoculados con 0.02 unidad de suero patrón antiodematiens, más 1 test-dosis y cantidades mínimas de toxina, superiores o inferiores a este test-dosis.

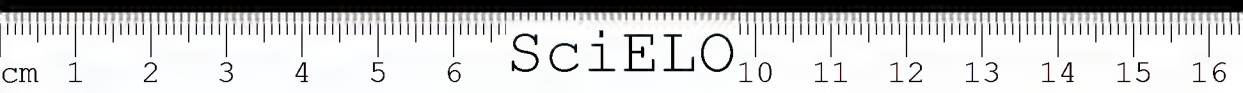
Los testigos indicarán si la cantidad de toxina empleada como test-dosis es exacta, o si fue usada una dosis demasiado grande o muy pequeña como test-dosis.

El porcentaje de animales sobrevivientes indicarán la protección aproximada conferida por el suero en prueba. Para obtener resultados más exactos, es necessario hacer dosages definitivos.

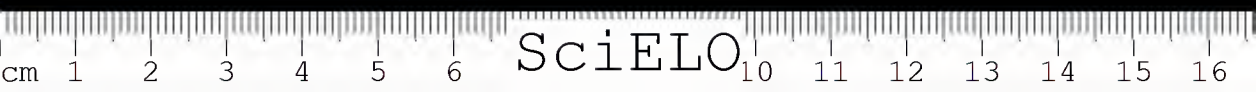
Dosages definitivos.

La técnica a usar es la misma empleada en los ensayos previos, sólo que en estos casos el número de animales de experiencia debe ser aumentado a 10 ó 12 para cada dosage.

Metodo intracutaneo.

El suero antiodematiens puede ser también dosado por via intracutáneo.

BIBLIOGRAFIA

1. *Bengtson, I. A.* — "The official United States and International unit for standardizing Gas Gangrene Antitoxin (Oedematiens)". Public Health Reports **51** (11): 266. 1936.
2. *Celareck, J. y Stelkiewicz, S.* — "Contrbution a l'étude des hémotoxines de la gangrene gazeuse". C. R. Soc. Biol. **122** (16): 143. 1936.
3. *Glotova, H. V.* — "Étude comparée des sérums étalons anti-gangréneux internacionaux et soviétiques". Ann. Inst. Pasteur **59** (5): 526. 1937.
4. *Humphreys, F. B., Gay, F. P.* — "Agents of diseases and Host Resistance". E. & Thomas New York, 1935.
5. Medical Research Committee — Report on the anaerobic infections of wounds and the Bacteriological and serological problems arising therefrom — Special Report Series (39): 188. 1919.
6. *Meisner, H. y Schoop* — "Die islandische Bradapest im Vergleich mit der deutschen Bradsot". Acta. Patol. Microb. Scand. Sup. **18**: 165. 1934.
7. *Oms, F V.* — "Preparación del suero antigangrenoso". Morata, Editor. 1929.
8. *Sordellii, A.; Ferrari, J. y Mayer, E.* — "Medición del suero anti-oedematiens". Rev. Inst. Bact. **5** (5): 573. 1919.
9. *Walbum, L. E., Reymann, C.* — "A proposed international Standard for gas gangrene antitoxin (Oedematiens)" Quarterly Bull. Health Organization League Nations — Special Number — Biological Standardisation, Extract E., 1, 1935.
10. *Walbum, L. E. e Reymann, G. C.* — "The production of toxin by Clostridium oedematiens (B. novyi)". Jour. Pathol. Bact. **46** (2): 1937.
11. *Weinberg, M., Nativelle, R. y Prévot, A.* — "Les microbes anaerobies": 263. Masson & Cie. Paris. 1937.
12. *Weinberg, M. y Prévot, A.* — "Nouvelles recherches sur les anatoxines gangreneuses, leur emploi dans la vaccination du cobaye et la préparation des serums specifiques". C. R. Soc. Biologie **92**: 1484. 1925.
13. *Weinberg, M. y Seguin, P.* — "Du serum anti-oedematiens". C. R. Soc. Biologie 18 552: 507. 1915.
14. *Weinberg, M. y Seguin, P.* — "La gangrene gazeuse": 144. Masson & Cia. Paris. 1917.
15. *Sordelli, A., Ferrari, J.* — "Comunidad antigènica entre las toxinas de B. hemolyticus B gigas, B. perfringens y B. oedematiens". Folia Biológica **74** y **75**: 320. 1937.

615.37:616.245

PREPARACIÓN DEL SUERO ANTIGANGRENOSO

IV. Preparación del suero antihistolyticum

POR

ARIOSTO BÜLLER SOUTO y JUAN B. RIVAROLA

Jefe de la Sección de Anaerobios del Instituto Butantan (Brasil)

Jefe del Laboratorio de Seroterapia de la Sanidad Militar (Paraguay)

INTRODUCCIÓN

La propriedad del *Cl. histolyticum* de producir toxina específica se debe a los estudios de Weinberg y Seguin (20).

La toxina obtenida era termolábil, no hemotóxica llegando al máximo de su concentración con 18 a 24 horas de incubación a 37° C, en un caldo de carne con o sin glucosa y con trozos de carne en el fondo, recubierto con parafina líquida para assegurar las condiciones de anaerobiosis.

El Medical Research Committee (8) demostró que la toxina de *Cl. histolyticum* podia ser producida en culturas de caldo de carne después de incubación durante 14 a 16 horas. Después de 18 horas la toxina seria destruída.

Mac Intosh y Bulloch (7) acentuaron las graves reacciones locales producidas en el sitio de la inoculación.

Mita (9) empleando caldo de hígado con pH 7.2 a 7,8 pudo obtener excelente toxina después de 24 horas de incubación.

Stewart (13) estudió la influencia de la reacción del medio, el periodo de incubación, el efecto de la adición de glucosa, y los resultados obtenidos con dos diferentes tipos de peptona, en la produción de toxina histolytica. Con infusión de carne conteniendo 1 % de peptona, 2 % de glucosa y con pH 7,6 pudo obtener buenas toxinas (D M L para la laucha de 0.002 a 0.005 c.c.). Las variaciones de pH podian ir de 6,8 a 7,8 sin que la producción de toxina se alterase sensiblemente, siempre que las demás condiciones del medio fuesen óptimas, asi como las condiciones de anaerobiosis satisfactorias.

Con infusión de carne, más 1 ó 2 % de peptona, Stewart pudo obtener toxinas más potentes con una D M L para la laucha de 0.002 c.c. a 0.005 c.c. obteniendo también fuerte hemolisis (0.1 c.c. de cultura da completa hemolisis de 0.5 c.c. de suspensión al 5 % de glóbulos rojos de conejo lavados). La prueba de nitroprusiato de sodio para la verificación de la presencia del grupo sulfidrilo era fuertemente positiva.

I. — Preparación de la toxina

Cepa

Para obtener buenas toxinas es menester usar muestras toxigénicas frecuentemente repicadas. Las muestras usadas para la preparación de toxina no deben tener nunca más de 18 horas. Cuando se usan culturas más viejas se constata una acentuada disminución de la D M L de la toxina.

Pasajes intermedios en cobayos exaltan el poder toxígeno de las muestras.

El poder toxígeno no se altera cuando se conservan las muestras toxigénicas en la heladera y son repicadas en caldo clara de huevo.

Smith (11) ha observado alteraciones en la estructura antigénica de *Cl. histolyticum* en relación a las variaciones S—R. Este autor llama la atención en el sentido de que las variaciones en la estructura antigénica de los anaerobios esporulados no han sido suficientemente estudiadas.

Existiendo por otra parte estrecha correlación morfológica y bioquímica (5) entre el *Cl. histolyticum* y el *Cl. sporogenes* es necesario especiales precauciones a este respecto.

En el Instituto Butantan poseemos 16 cepas para la preparación de suero anti-histolyticum.

Medios de cultivo

A).	Higado	500 gramos
	Peptona Chapoteaut	10 gramos
	Agua	1000. c.c.

Operar así:

1. — Lavar el hígado.
2. — Pasar por la máquina.
4. — Macerar durante 12 horas a la temperatura ambiente.
5. — Hervir a fuego lento, 15 minutos.
6. — Colar en paño.
7. — Filtrar por papel N. 50.

8. — Agregar la peptona. Ajustar a pH 8.0.
9. — Llevar al autoclave a 120° C durante 20 minutos.
10. — Filtrar nuevamente por papel de filtro.
11. — Distribuir en balones agregando trozos de higado y vaselina líquida.
12. — Esterilizar a 115° C durante 30 minutos.
13. — Ajustar el pH a 7.8.
14. — En el momento de usar calentar a 70° en baño maria y enfriar bruscamente a 37° C. Hacer las siembras con cultivos preparados de antemano de *Cl. histolyticum.*

B). — En comunicación personal el Doctor Reymann nos indicó el siguiente medio:

"Aus unseren Aufsatzen werden Sie ersehen, dass wir fur die Versuche einen Apparat mit Umrühren verwenden; in der taglichen Toxindarstellung tun wir dies nicht, sondern verwenden 1 ½ Literkolben, die dann und wann geschwenkt werden, weil dies bei der immer launischen Toxinbildung es erlaubt, jeden einzelnen Kolben auszutitrieren".

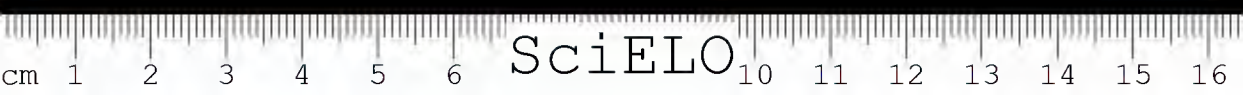
"Für die Toxindarstellung mit B. histolyticus un B. Sordelli verwenden wir dasselbe Nahrmedium wie bei den anderen Anaeroben und zwar bei Histolyticus mit 0.5 % Glucose aber mit einer Bebrütungszeit auf 48 Stunden. In beiden Fallen bei pH 7,5. Bei sammtlichen toxigenen Anaeroben wirkt ein Zusatz von 5—10 % normalen Pferdeserun auf die Toxinbildung fordernd ein.

En trabajos posteriores con Walbum, aconseja Reymann (16) adicionar al medio arriba descripto, 1 % de peptona Riedel. Ajustar el pH a 8.0 antes de autoclavar, el cual después de autoclavado cae a pH 7,9.

Los medios de cultivos estériles, en balones de 1 litro, son conservados en la heladera. Immediatamente antes de uso adicionar al medio, 20 a 30 gramos de carbonato de calcio por litro y la cantidad necesaria de glucosa (de una solución al 50 %). El caldo es entonces hervido y su superficie recubierta con una capa de parafina líquida estéril.

Stewart (13) usa caldo-infusión de carne con 1 % de peptona Witte y pH 7,6, distribuido en frascos de 2 litros. En el momento de sembrar calienta durante dos horas a vapor fluente y enfría a 40° C.

Condiciones que favorecen la producción de toxina.

1. — La agitación suave.
2. — La adición de cloruro de calcio que impide que el pH caiga por debajo de 6. La toxina se conserva mejor a pH 6 ó pH 6,5.
3. — La adición de hígado, músculo fresco, carne cocida o suero de caballo.

4. — La adición de peptona, rica en grupos sulfidrilo.

Condiciones que atenuan la toxina.

1. — La filtración.
2. — El tiempo de permanencia en la estufa (más de 18 horas).
3. — La falta del calentamiento previo del medio.
4. — La acción directa de la luz solar sobre el medio, aun antes de sembrado.
5. — La permanencia prolongada del medio de cultivo a la temperatura ambiente. Después de haber hecho la prueba de esterilidad debe ser conservada en el frigore.
6. — La acidez del medio o de la toxina. El pH debe estar a 6, ó 6,5.

Condiciones que no influyen.

La adición de Permutito para retirar cualquier trazo de histamina proveniente del caldo hígado. La adición de cisteina.

El pH inicial del medio que puede estar entre 6,8 a 7,8.

Obtención de la toxina.

La toxina del *Cl. histolyticum* pasa dificilmente a través de la vela filtrante; esta la retiene en su mayor parte. Las velas Chamberland retienen más toxinas que las velas Berkefeld.

El poder tóxico de los filtrados es igual a um tercio o a una mitad del poder tóxico de la toxina original. La centrifugación a alta velocidad por medio de centrifugadoras refrigeradas proporcionan toxina con elevada D M L y muy pocos gérmenes, óptimas para inmunización.

Acción de toxina.

Inoculada por vía venosa la toxina histolítica produce acción letal aguda.

Por vía muscular produce acción necrótica muy activa, disolución del tejido muscular, lisis de los núcleos y vaciamiento completo de las fibras quedando sólo el sarcolema. La fibra muscular se llena de sangre coagulada. La acción de la toxina no es específica solamente para el músculo, degenerando también profundamente los órganos.

Sobre el *aparato circulatorio* se manifesta por una aceleración de los movimentos cardíacos y aumento de la presión arterial. El músculo cardíaco sufre intensa acción degenerativa cuando la toxina es inoculada por vía venosa.

Las paredes vasculares se rompe debido a la acción histolizante de la toxina y se produce hemorragias difusas, la sangre se mezcla al tejido muscular licuefacto.

Sobre la sangre. — El *Cl. histolyticum* no sec-eta hemosilina para los hematies del hombre, carnero y cobayo.

Sobre el aparato respiratorio. — Produce taquipnea al comienzo e intensa disnea en el periodo preagónico.

Sintomatologia.

Conforme ya había sido verificado por el Medical Research Committee (8) la acción de la toxina histolitica se asemeja a la acción del V. séptico en lo que se refiere al periodo de incubación. En ambos el periodo de incubación no existe. Las lauchas inoculadas con dois altas de toxina caen como fulminadas muriendo instantáneamente. Después de la inyección intramuscular, las lauchas tórnanse intensamente disneicas, ejecutan movimientos desordenados, las patas anteriores quedan paralizadas, los músculos del cuello presentan contracturas violentas y espasmódicas, agitan la cabeza en todo sentido, procuran arrastrarse con auxilio de las patas posteriores sobreviniendo una fase de violentas convulsiones. El animal cae sobre un lado, ejecuta rapidísimos movimientos con los miembros posteriores. La respiración se torna difícil y muy lenta. La laucha cae en coma y muere respués de un tiempo más o menos corto.

Necropsia.

La toxina histolitica reproduce *in vitro* como *in vivo* todos los fenómenos observados con el cultivo. Si el animal es sacrificado poco tiempo después de inoculada la toxina en el músculo de la pata, se constata la existencia de un edema blando, depresible que invade una parte del abdomen. Al comienzo muestra la existencia de una masa hemorrágica en el tejido conjuntivo subcutáneo encontrándose coágulos enrojecidos. El tejido subcutáneo y perimuscular es fuertemente alterado o en vías de digestión intensa. La lesión se prolonga por un edema suero-hemorrágico que invade el tejido conjuntivo del abdomen. Si el animal muere al fin de un periodo más o menos largo se constatan un edema disecante y una alteración completa de la arquitectura de los elementos del tejido muscular. Las células todavia aisladas degeneran, las fibras mus-

culares están vacuolizadas y presentan al corte un aspecto fenestrado. Los músculos están disociados y licuefactos, lo que se puede verificar externamente por la palpación del miembro. Esta histolisis llega a todos los tejidos, desde la piel hasta el hueso. La epidermis es roja violásea. La lesión se abre espontáneamente al fin de 12 a 16 horas dejando ver una papilla hemorrágica constituída por tejidos degenerados. El femur, la tibia y el peroné quedan completamente desnudos.

Los ligamentos articulares son a veces alcanzados y el miembro se destaca espontáneamente existiendo una auto-amputación inflamatoria. Esta histolisis no es pútrida ni gaseosa. Si la histolisis llega a la pared abdominal y peritoneal encontraremos en la autopsia las asas intestinales haciendo hernia, exteriormente.

El bazo se presenta hipertrofiado, friable y de un color rojo negruzco.

Las cápsulas suprarenales hemorrágicas. El higado congestionado y aumentado de volume. Los pulmones puedem estar normales o presentar signo de edema y congestión. El músculo cardiaco tal como acentúa Robertson (10) presenta profundas alteraciones degenerativas.

Determinación de D M L.

Esta determinación se hace en lauchas blancas de 17 a 20 gramos por via venosa.

Preparación de la toxina seca.

Se prepara de acuerdo a la técnica empleada para la preparación de la toxina seca del *Cl. perfringens.*

Determinación de la D M L de la toxina seca.

Diluir la la toxina en solución salina o caldo con pH 7.0 (con caldo títulos obtenidos son mayores debido a la acción protectora de la peptona) e inocular lauchas de 17 a 20 gramospor via venosa. Aprovechamos las toxinas secas muy fuertes para toxina patrón; las toxinas más débiles son aprovechadas para inmunización.

II. — Preparación del suero antihistolyticum.

El animal de elección es el caballo. El caballo es muy sensible a la acción de la toxina. La inoculación de esta toxina provoca en los tres primeros

meses de inmunización, edema y formación de colecciones liquidas que llegan a tomar un gran volumen. La piel que recubre esta colección se adelgaza considerablemente y clinicamente podria concluir por la existencia de un abceso purulento con inminencia de romperse. Entre tanto esta colección no se rompe, el liquido se reabsorbe poco a poco acabando por desaparecer completamente al fin de 8 a 10 dias.

Weinberg, Nativelle, y Prevot, (18) afirman que esta colección es una colección hemorrágica provocada por la destrucción de algunos vasos y del tejido subcutáneo producida por el fermento fibrinolitico. Durante la inmunización los animales pueden presentar reacciones generales intensas. Las reacciones locales se caracterizam en el punto de inoculación por grandes abcesos que se funden produciendo extensa ulceración o cicatrización consecutiva. El pus es amarillo rojizo, gomoso, encontrándose alli el *Cl. histolyticum* en abundancia.

Inmunización.

La inmunización se inicia con suero antigangrenoso (sólo en la primera dosis) y anatoxina centrifugada, pasándose a anatoxina sola. Después de la inoculación de 300 c.c. de Anatoxina sola, se practica una sangria de prueba. Si el suero pose e anitoxina en cantidad suficiente se pasa a toxina. Las toxinas para inmunización podrán ser secas o frescas conservadas sob toluol.

A los antigenos específicos asociamos ciertas substancias estimulantes tales como tapioca o cloruro de calcio o lanolina. A fin de producir un estímulo mayor asociamos a estos antigenos inespecificos cuerpos microbianos homólogos tal como hicimos con los demás sueros. Algunos animales fueron inmunizados con anaculturas.

Preparación de los cuerpos microbianos.

Operar asi:

1. — Centrifugar las culturas.
2. — Diluir el depósito de centrifugación en 10 % de solución salina fisiológica y en relación al volumen centrifugado.
3. — Agregar formol al 4 por mil en proporción a la cultura centrifugada.
4. — Agitar vigorosamente.
5. — Dejar en la estufa por 4 dias a 37.º C.
6. — Verificar esterilidad para aerobios y anaerobios.
7. — Lavar los cuerpos microbianos en agua fisiológica dos veces seguida, centrifugando cada vez y renovando el agua fisiológica.

8. — Recoger el depósito en Placa de Petri con mínimo posible de liquido.
9. — Desecar al Vacio sulfúrico.
10. — Pesar la cantidad total obtenida a fin de hacer las proporciones entre la Toxina bruta y la cantidad de cuerpos microbianos obtenidos.

Importante. — El grado de dilución tiene mucha importancia. Emulsiones poco voluminosas y muy densas provocan abcesos. Diluciones muy voluminosas prvocan largas placas de induración en el punto de inoculación y a veces grandes abcesos que pueden interrumpir las inoculaciones siguientes. Es necesario pues usar volúmenes medios, dosis de 50—100—150 c.c. que deben ser inoculados conforme al peso de los microbios a inyectar.

Esquema:

Preparación de anaculturas.

Adicionar a la toxina bruta formol al 5 por mil y dejar en la estufa a la temperatura de 37. C durante 15 dias. Puede dejarse 8 días adicionando formol al 10 por mil (Weinberg y Prevot).

Preparación de la anatoxina.

Se prepara de acuerdo con la técnica de Weinberg y Prevot (19). Se adiciona formol al 1,5 a 3 por mil y se deja en la estufa a 37.° C durante 7 a 8 dias.

Control. — La dosis de 3 a 5 c.c. de esta Anatoxina así preparada no debe provocar reacción inflamatoria en el cobayo (por vía subcutánea).

III. — Dosificación del suero antihistolyticum.

La Comisión Permanente de Standardización Biológica reunida en Copenhague en Noviembro de 1932 decidió que la Antitoxina de la Gangrena Gaseosa (histolyticum) debia ser preparada en lineas generales, de acuerdo con la técnica aconsejada para la preparación de antitoxina de la gangrena gaseosa (perfringens). Fue propuesta y aceptada por el Comité Permanente de Patronización Biológica de la Liga de Naciones y por el National Institute of Health de Washington (1) un nuevo Patrón internacional para la antitoxina de Gangrena gaseosa (histolyticum) determinado por Walbun y Reymann (6), (14) y (15).

Naturaleza del Patrón.

La unidad antihistolítica internacional es definida como la actividad antitóxica específica ejercida por 0.3575 mgs. de la preparación seca y estable de suero antihistolítico.

Una unidad internacional corresponde a 1 unidad francesa y equivale a 3 unidades alemanas.

Preparación del Patrón.

Es preparado de suero natural separado do un caballo inmunizado contra toxina de Gangrena Gaseosa (histolyticum) y conservado sin adición de antisépticos.

El suero para ser usado como Patrón debe tener título elevado. Es distribuído por medio de aparatos especiales o de pipetas aforadas en ampollas en la cantidad de 5 c.c. Las ampollas son colocadas en desecadores conteniendo cloruro de calcio y ligado al vacuo hasta que el contenido de las ampollas den la apariencia de estar seco. Esto se observa al fin de 2 ó 3 días, siendo necesario durante este tiempo cambiar el cloruro de calcio contenido en el desecador.

Colócase las ampollas en otra serie de desecadores conteniendo anhidrido pentafosfórico conservándolas aquí por 2 ó 3 meses hasta completa desecación. Una que otra vez son retiradas y pesadas. Cuando alcanzaren un peso constante son lienadas con nitrógeno y cerradas, conservándose en la obscuridad y a la temperatura de 4.° C.

Uso del Patrón.

De acuerdo con Therapeutique Substances Act (1925) el suero Patrón debe ser disuelto en solución glicerinada (gicerina neutra 2 partes, solución salina fisiológica con pH 7.0 una parte).

El poder antitóxico en unidades de antitoxina de gangrena gaseosa (histolyticum) es determinado por inyecciones en animales (lauchas) de una mixtura de la antitoxina en prueba con la toxina de la gangrena gaseosa (histolyticum) que fue standardizada en relación de la Antitoxina patrón de gangrena gaseosa (histolyticum).

Animales usados.

Para la standardización de la Antitoxina de la Gangrena gaseosa (histolyticum) puede usarse cobayos y lauchas blancas, siendo preferibles las lauchas

blancas, tal como recomienda el Comité Permanente de Standardización Biológica de la Liga de las Naciones, por ser más simples, rápido, económico y preciso. Son necesarias lauchas de la misma generación y con peso uniforme de 17 a 20 gramos.

Toxina Patrón para los dosages.

Para la dosificación de la Antitoxina de la Gangrena gaseosa (histolyticum) es esencial tener una Toxina Patrón de la gangrena gaseosa (histolyticum) seca, estable y exactamente standardizada.

Determinación de test-dosis de toxina Patrón.

Definición. — Test-dosis (L t) de toxina antihistolyticum es la cantidad de toxina que mixturada con 1 unidad de antitoxina Patrón mata un cierto número de lauchas inoculadas, pero no todas (más o menos el 50%).

Para la determinación del test-dosis preparar las siguientes diluciones:

1.º — 1 c.c. de solución de antitoxina Patrón (histolyticum) es diluído de manera que 1 c.c. de la dilución contenga 5 unidades patrón.

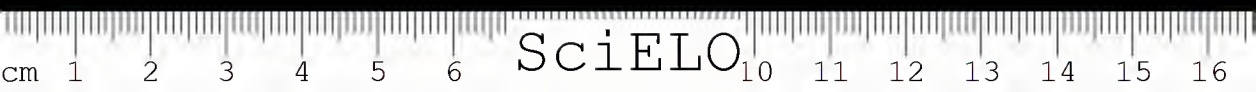
2.º — Una cierta cantidad de toxina seca es rápida y rigurosamente pesada y disuelta en solución salina con pH 7.0. El volume debe ser ajustado de tal manera que 10 miligramos de toxina estén contenidos en 1 c.c. de la dilución.

Una vez determinada el test-dosis, las ampollas que contienen la toxina seca deben permanecer rigurosamente cerradas y al abrigo de la luz.

Las mixturas de la dilución de la Antitoxina Patrón y de la dilución de toxina son echas en un volume total de 0.5 c.c. (cantidad a ser inyectada en cada laucha), la cual deberá contener 0.2 c.c. de Antitoxina diluída (1 Unidad), más cantidades variables de la dilución de Toxina.

Las mixturas son dejadas a la temperatura ambiente durante 2 horas, formándose un ligero precipitado que debe ser removido por la centrifugación. La solución bien límpida es inyectada en la vena de las lauchas (0.5 c.c.).

Los animales serán observados durante 3 días.

El test-dosis contiene en general 30 D M L.

Dosaje de antitoxina histolyticum de valor desconocido

(Ensayos previos).

Preparar las siguientes diluciones:

a) — Dilución del suero en prueba.
b) — Preparar la dilución de toxina Patrón.

La toxina es rigurosamente pesada y disuelta en solución salina, de manera que 1 L t esté contenido en 0.2 c.c.

Las mixturas de las diluciones del suero a dosar con el L t son hechas en volume total de 0.5 c.c. en tubos especiales, los cuales deberán contener cantidades variables del suero a dosar diluído más 0.2 c.c. de test-dosis y más la cantidad necesaria de solución salina para completar el volumen total de 0.5 c.c.

La cantidad de solución salina sobrante servirá para lavar el tubo, después de haber retirado la mixtura suero-toxina.

Las diluciones antes de inoculadas son dejedas a la temperatura ambiente durante 1 hora.

La dosis total de 0.5 c.c. es inoculada intravenosamente en cuatro lauchas blancas de 17 a 20 gramos mantenidas a temperatura constante. Aconsejamos el uso de pipetas certificadas para hacer las diluciones. Para las inoculaciones serán usadas jeringas metálicas de 1 c.c. divididas en centécimos, empleándose une jeringa para cada serie de diluciones.

Las lauchas inoculadas serán observadas durante 72 horas.

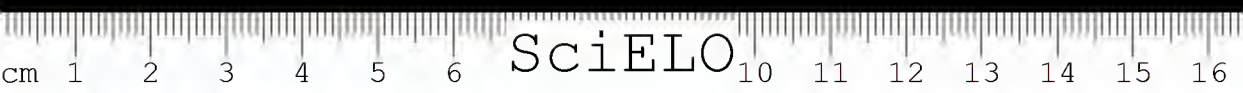
Testigos. — Cada dosage será siempre acompañado de su testigo. Sin este requisito los dosages no tendrán valor. Estos testigos serán inoculados con una mixtura de 1 unidad de suero antihistolyticum más test-dosis (L t) y cantidades mínimas de toxina superiores e inferiores a este test-dosis.

Los testigos sirven para indicar si la cantidad de toxina empleada como L t ha sido exacto o si hubo variación en más o en menos.

El porcentaje de animales sobrevivientes indica la protección aproximada conferida por el suero en prueba.

Dosajes definitivos.

A fin de obtener dosages más exactos serán hechos los dosages definitivos.

En estos casos, a técnica es la misma empleada en los ensayos previos, sólo que en estos casos el número de animales de experiencia debe ser aumentado a 10 ó 12 para cada dosis de diluciones mas aproximadas.

BIBLIOGRAFIA

1. *Bengtson, I. A.* — "The official United States and international unit for standardising gas gangrene antitoxin (Histolyticus)". Public Health Reports 51 (37): 1263. 1936.
2. *Celareck, J.; Stelkiewicz, S.* — "Contribution a l'étude des hémotoxines de a gangre-gazeuse". C. R. Soc. Biol. 122 (16): 143. 1936.
3. *Glotova, H. V.* — "Etude comparé des sérums ètalons anti-gangréneux internationaux et soviétiques". Ann. Inst. Pasteur 59 (5): 526. 1937.
4. *Hall, I. C. y Peterson, E.* — "A note on the mechanism of the peculiar lesions produced by B. histolyticus". Proc. Soc. Exper. Biol. and Med. 20: 502. 1932.
5. *Hoogerheide, J C.* — "Variability in morphological and biochemical properties of Clostridium histolyticum (Weinberg e Seguin). Jor. Bact. 34 (4): 387. 1937.
6. *Jensen, Cl.* — Étalon international proposé pour le sérum anti-histolytique". Bull Trim. Org. Hyg. Soc. Nations 5: 720. 1936.
7. *Mac Intosh, H. y Bulloch* — "The classification and study of war wounds". Med. Res. Committee. Special Report Series 12: 44. 1917.
8. Med. Res. Committee — "Reports of the Committee upon anaerobic infections of wounds and bacteriological and serological problems arising therefrom". Special Report Series 39: 26. 1919.
9. *Mita, T. M.* — "Untersuchungen ueber den Bacillus histolyticus". Japan Jour. Exper. Med. 12: 285. 1934.
10. *Robertson, M.* — "System of Bact. 3: 272".; His Majesty's Stationery Office London, 1929 .
11. *Smith, L.* — "Some serological aspects of the S-R change in Clostridium histolyticum". Jour. Bact. 34 (4): 409. 1937.
12. *Ssilanova, J. W.* — "Zur intrakutanen Werbstimung der-Gasodematoxine und Gasodemsera (Anti-perfringens anti-histolytikus und anti-vibrion-septique) und Kannichen". Centralblath für Bakt. 133: 149. 1935.
13. *Stewart, S. E.* — "Studies on the production of toxin by Clostridium histolyticum". Public Health Reports 51 (37): 1272. 1936.
14. *Walbum, L. E. y Reymann, G. C.* — "Memorandum concernign a proposed International Standard for gas gangrene antitoxin (histolyticus)". Extrat from the Depart. of Biol. Standards H. I. M. 1. 35: 1. Copenhague, 1935.
15. *Walbum, L. E. y Reymann, G. C.* — "Mémorandum sur un étalon international pour le sérum anti-histolytique". Bull. Trim. Org. Hyg. Soc. Nations 5: 752. 1936.
16. *Walbum, L. E. y Reymann, G. C.* — "The production of toxin by Bacillus histolyticus (Clostridium histolyticum)". Jour. Pathol. Bact. 46 (2): 315. 1938.
17. *Weinberg, M. y Guillaumie, M.* — "Titrage des sérums anti-gangréneux (anti-perfringens C. anti-perfringens D, anti-histolytique et anti-vibrion septique)". C. R. Soc. Biol. 127 (12): 1085. 1938.
18. *Weinberg, M.; Nativelle, R. y Prevot, A.* — "Les microbes anaerobies", pg. 380 Masson & Cie., Paris, 1937
19. *Weinberg, M. y Prevot, A.* — "Nouvelles recherches sur les anatoxines gangreneuses. leur emploi dans la vaccination du cobaye et la préparation des serums specifiques". C. R. Soc. Biol. 92: 1484. 1925.
20. *Weinberg, M. y Seguin, P.* — "Démonstration des lésions provoquées chez la cobaye par le B. histolyticus. Toxine de ce microbe." C. R. Soc. Biol. 80: 157. 1917.

615.37:616.245

PREPARACIÓN DEL SUERO ANTIGANGRENOSO

V. Estandardización del suero antigangrenoso

POR

ARIOSTO BÜLLER SOUTO y JUAN B. RIVAROLA

Jefe de la Sección de Anaerobios del Instituto Butantan (Brasil)

Jefe del Laboratorio de Seroterapia de la Sanidad Militar (Paraguay)

I. — Suero antiperfringens.

En el año 1930 la Comisión Permanente de Standardización Biológica de la Organización de Higiene de la Sociedad de Naciones (10) teniendo en cuenta las recomendaciones de la Conferencia sobre Standardización de Francfort (1928), estudió la posibilidad de un acuerdo internacional relativo a la adopción de un patrón para suero antigangrenoso (perfringens).

De acuerdo a los resultados alcanzados por los técnicos encargados de dar opinión sobre el Patrón internacional antigangreno o (perfringens) resolvió la Comisión (10) *recomendar como Patrón y unidad internacional, la preparación Patrón y la Unidad adoptada en los Estados Unidos de América* y encomendar al "Statens Serumistitut", para funcionar como Laboratorio Central de la Organización de Higiene de la Sociedad de Naciones y asimismo conservar y distribuir esta preparación Patrón internacional.

De acuerdo con el método entonces propuesto:

1.º — El suero antigangrenoso (perfringens) podia ser dosado con gran precision.

2.º — El método de inyeccion intravenoso en lauchas, de la mixtura de toxina y antitoxina es simple y práctico dando resultados concordantes y comparables aplicado por investigadores diversos.

3.º — Las preparaciones estables y secas de suero antigangrenoso (perfringens) pueden ser estabilizadas y tituladas en relación al Patrón americano, siendo posible preparar soluciones perfectamente patronizadas, proprias para ser remitidas a los laboratorios y ser usadas en dosages biológicos.

La unidad internacional adoptada corresponde a 1/100 de Unidad americana, anterior a las "Instrucciones Oficiales" del 10 de Diciembre de 1930 del National Institute of Health.

Para relacionar, pues, unidades internacionales a unidades americanas *antiguas*, se debe multiplicar los resultados por 100.

Procurando relacionar el valor terapéutico de suero perfringens a los titulos obtenidos en unidades internacionales, Weinberg, Davesne y Prevot (18) pudieron concluir que el suero antiperfringens titulado 100 unidades antitóxicas por c.c. protege los cobayos por lo menos contra 2 D M L de cultura de Cl. perfringens, mismo en la dosis de 1/200 c.c. Sueros antiperfringens medios deben dosar por lo tanto como mínimo 100 unidades antitóxicas por c.c. para tener valor terapéutico.

Prigge (11) por orden del Ministerio de Guerra del Reich realizó experiencias en las cuales se basaron las "Vorschriften für die staatliche Prüfung der (Perfringens) Sera" de 1 de Mayo de 1937. (11).

Para poder ser usadas en las dosificaciones las toxinas deben ser ricas en Z-toxinas, factor principal de la intoxicación perfringica esencial y contener porcentaje mínimo de componente hemotóxico W o Alfa-toxina.

Según las instrucciones, sólo son considerados dosando, los sueros que protegen un número de animales mayor o más o menos igual a aquellos animales protegidos por el suero Patrón. Para esto es necessario trabajar siempre con lotes grandes de animales, teniendo en cuenta que las variaciones en la relación individual es tan grande, que análisis realizados al mismo tiempo, con el mismo suero y con las mismas dosis de toxina pueden no presentar resultados idénticos.

El factor reaccional individual sólo puede ser menospreciado cuando se usan series grandes de animales. Aun así, no siempre se puede esperar que sobrevivan 50 % o mueran 50 %. Si son usados seis animales, los números de sobrevivientes son bastante diferentes: 2/6, 4/6 ó hasta 1/6. Estos hechos deben ser tomados en cuenta cuando se organizan estadisticas *muerte/vida*.

Las instrucciones del Ministerio de Guerra del Reich exigen para el suero antiperfringens la tasa minima de 100 unidades internacionales de antitoxina por c.c.

Estas exigencias son provisorias, pues el título mínimo tendrá que ser elevado en cuanto se torne posible la obtención de sueros con titulos medios más altos.

Weinberg y Guillaumie (19) verificaron que el método recomendado por la Liga de las Naciones no daba una precision rigurosa; los titulos, sólo eran titulos aparentes y no titulos reales.

Los dosages mostraron la inexistencia de regularidad en las variaciones de los titulos antitóxicos obtenidos, dosando varios sueros con varias toxinas, y dosando varios sueros con la misma toxina.

Estas variaciones fueron atribuídas en principio, a la constitución de la toxina, a la constitución del suero específico o a la reactividad del animal usado para la prueba. Alejado el tercero factor, mediante un criadero bien dispuesto y perfectamente controlado, se admite generalmente que las variaciones del título antitóxico son debidas, sobre todo, a la variabilidad de la constitución de la toxina y la calidad del suero. Los títulos reales de los sueros antitóxicos perfringens, deben ser obtenidos, con toxinas bastante purificadas, a fin de reducir al mínimo las influencias que ejercen sobre los resultados los constituyentes no específicos del suero.

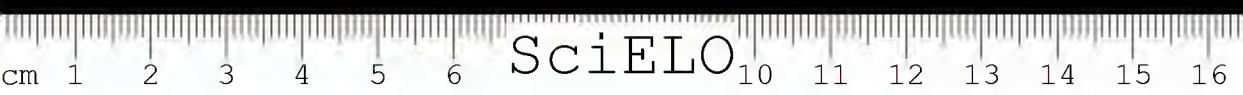
Estas variabilidades de los títulos antitóxicos, pueden ser tal vez atenuadas empleando toxinas-tipo preparadas con muestras de *Cl. perfringens* aisladas por el método de las células únicas y cultivadas en medios sintéticos apropriados.

A fin de obtener títulos comparables, sería aconsejable que las titulaciones de los sueros específicos fueran practicados con test-dosis de una toxina estabilizada y remitida juntamente con la toxina Patrón por la Comisión Permanente de Estandardización Biológica de la Liga de las Naciones.

Con el fin de conseguir el valor real o valor terapéutico de un suero antiperfringens, recomiendan los autores arriba citados (20) que el suero Patrón sea preparado con un suero de título antitóxico muy elevado, o mejor aun, con una mixtura de sueros específicos de titulos los más elevados posibles, o que las mixturas utilizadas en las titulaciones sean ricas en cada uno de los anticuerpos exo y endotóxicos de *Cl. perfringens*, tipo A.

Otras veces los títulos bajos hallados para un determinado suero antiperfringens tipo A, cuando se usa una cierta toxina tipo A, no es real sino aparente, porque la neutralización de la toxina por los anticuerpos del suero examinado es imposibilitado por constituyentes no específicos del suero o por constituyentes no específicos de la misma toxina. O cierto antigenos de la toxina no son neutralizados por el suero o es que falta en el suero ciertos anticuerpos capaces de neutralizar estos antígenos correspondientes o finalmente porque los contiene en débil proporción. Además el *Cl. perfringens* en medios culturales diferentes y con período de incubación también diferentes, produce antígenos tóxicos en proporciones variables.

El valor del test-dosis de cada muestra de toxina varia con los sueros usados para las titulaciones; esta variación es debida a la variabilidad de la constitución de las toxinas y de los sueros.

La neutralización de la toxina de *Cl. perfringens* tipo A por su suero homólogo es un problema muy complejo y todavía se complica más, cuando se encara la neutralización de las varias toxinas de los diferentes tipos de *Cl. perfringens* por su holosuero homólogo, pues estas variaciones pueden ser también observadas cuando se determinan los títulos antitóxicos de sueros antiperfringens tipo C y tipo D por las toxinas homólogas (22).

El titulo antitóxico real de un suero debería indicar su riqueza en anticuerpos contra todas las toxinas de una especie microbiana. lo que se tornará posible, sólo cuando se consiga disociar o purificar todos los constituyentes específicos de la toxina perfringens tipo A o de los sueros antiperfringens tipo A. Los resultados de los dosabes serán perfectamente comparables cuando todos los laboratorios usen las mismas toxinas y las mismas unidades de sueros antiperfringens tipo A. Y se comprende que sea así, admitiendo que una unidad padrón es en cierto modo una entidad localizada y definida y no un fenómeno abstracto; ella existe realmente y está situada en el espacio, según opina Jensen (9).

El método de elección para determinar el valor de un suero antiperfringens es la determinación de su titulo curativo. El suero Patrón antiperfringens actualmente es enviado por el Laboratorio Central de Statens Seruminstitut a los laboratorios interesados. Sería útil que cada país tuviese un Laboratorio Seroterapico Oficial como es el Instituto Seroterápico Butantan que pudiese distribuir substandards locales patronizados en relación a los Patrónes de la Liga de las Naciones enviados por el Statens Seruminstitut. Estas substandards locales seriam preparados con toxinas autóctonas y estas producidas por muestras de Cl. perfringens tipo A aisladas de casos locales de gangrena humana, los sueros Patrónes seriam de otra parte preparados con estas toxinas autóctonas. Tal vez las muestras de determinadas regiones puedan producir de esta manera factores tóxicos ausentes en muestras oriundas de outras regiones. Estos sueros patrones y toxinas enviadas como substandard tal vez contribuyan a la obtención de mejores sueros, de resultados terapéuticos más eficientes.

II. — Estandardización del suero antioedematis maligni (vibrión séptico).

La Comisión Permanente de Patronización Biológica reunida en Londres el 23 de Junio de 1931 recomendó que fuese estudiada la posibilidad de realizar un acuerdo internacional para la adopción de un Patrón para el suero antioedematis maligni (vibrión séptico), tomando por base los mismos principios seguidos para el suero antiperfringens (13).

El National Institute for Medical Resarch de Londres dando cumplimiento a estas recomendaciones estableció, gracias a la cooperación del Profesor Weinberg, un nuevo Patrón. Teniendo en cuenta los trabajos del National Institute for Medical Research pudo la Comisión recomendar (14) "que la preparación desecada estable de suero antivibrión séptico establecido por National Institute for Medical Research de Londres con ayuda de los productos puestos a su disposición por el Profesor Weinberg del Instituto Pasteur de París, sea adoptado como Patrón Internacional de este suero, y que una unidad internacional sea definida como la actividad antitóxica específica ejercida por 0.2377 mgs de esta preparación Patrón desecada."

Por sugestión del Profesor Martin fue especificado que una unidad neutraliza una cantidad correspondiente a cerca de 24 D. M. L., para la laucha, de la toxina usada en las experiencias de determinación.

El suero antioedematis maligni (vibrión séptico) puede ser dosado de acuerdo con la técnica propuesta por Hartley y White (7).

La unidad internacional propuesta equivale a la mitad de una unidad americana y a 2 unidades franceses, siendo 5 veces menor que la unidad soviética.

1 unidad internacional es igual a 0.2 unidad soviética, igual a 0.5 unidad americana e igual a 2 unidades francesas..
1 unidad franiesa es igual a 0.5 unidad internacional e igual a 0.25 unidad americana.

Esta nueva unidad fue aprobada por el National Institute of Health de Washington (2) y adoptada oficialmente desde 1.° de Junio del año 1935.

Para obtener resultados en unidades internacionales en los casos en que se ha usado el patrón americano antiguo, basta multiplicar los resultados por 2. Y si se ha usado el patrón francés dividir los resultados por 2 a fin de obtener los dosages en unidades internacionales.

La unidad internacional antioedematis maligni es 5 veces menor que la unidad soviética (5).

Antes de los trabajos de Weinberg, Davesne y Prevot (18) se exigía que un suero antivibrión séptico debía tener como mínimo 250 unidades francesas para uso terapéutico, siendo actualmente exigido con este fin el dosage mínimo de 125 unidades internacionales.

Weinberg y Guillaumie (22) demonstraron por otra parte que el suero antioedematis maligni (vibrión séptico) podía ser dosado por el método internacional con un error solamente de 10 a 20 %.

III. — Estandardización del suero antioedematiens.

La Comisión Permanente de Standardización Biológica resolvió en el año 1932 recomendar al "Statens Serum Institute" de Copenhague que hiciese un patrón estable de suero antioedematiens.

Gracias al patrón propuesto por el "Statens Serum Institute" el poder antitóxico de un suero antioedematiens puede ser medido con toda la exactitud deseable. La comisión recomienda (15) "que la preparación desecada estable de suero antioedematiens del "Statens Serum Institute" de Copenhague sea adoptada como Patrón internacional y que una unidad internacional sea definida como la actividad antitóxica específica ejercida por 0.2681 mgs de esta preparación desecada".

Por sugestión del Profesor Martin fue especificado que: una unidad neutraliza una cantidad correspondiente a cerca de 1400 D M L para la laucha de la toxina en las experiencias determinación.

El suero antioedematiens, puede ser dosado de acuerdo con la técnica propuesta por Walbun y Reyman (16).

La unidad internacional propuesta equivale a 10 unidades francesas y a 50 unidad alemanas.

1 Unidad francesa es igual a 5 unidades alemanas e igual a 0.1 unidad internacional.

La relación entre una unidad internacional y 1 unidad soviética es de 1/3.5.

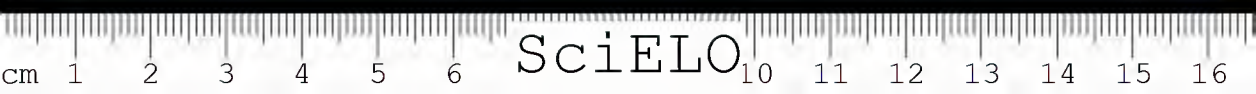
Esta nueva unidad fue aprobada por el National Institute of Health de Washington (3) y adoptada oficialmente desde el 1 de Abril de 1936.

El Instituto Tarassévitch de control de sueros y vacunas de Moscou, llama la atención en el sentido de que el método internacional de standardización de suero antioedematiens difiere esencialmente de los métodos usados para los otros sueros. La diferencia no es solamente sobre el valor de la unidad antitóxica sino también sobre la via de inoculación: la via venosa es sustituida por la vía muscular.

Experiencias hechas en el Instituto de Medicina Experimental de Leningrado y en el Instituto de Microbiologia y Epidemiolgía de Moscou mostraron que los resultados obtenidos por el método intramuscular es mucho menos preciso de aquellos obtenidos por inyecciones endovenosas. A veces por el método intramuscular se constata 100 % de muertes y la otro día con la misma dosis no se ocasiona muerte alguna.

Glotova (5) cree que las dificultades encontradas para establecer el test-dosis (L t) de la toxina oedematiens es consecuencia de la via muscular utilizada. Los músculos del muslo de la laucha, son en efecto, tan pequeños y la cantidad de 0.1 c.c. tan insignificante, que puede acontecer que la extremidad de la aguja toque el hueso o penetrando hasta la aponeurosis, la inyección no sea estrictamente intramuscular. La absorción de toxina es por este motivo retardada y los resultados falsos, pues sabemos que las cantidades mínimas de toxina 0. mg. 1, por ejemplo, puede modificar enteramente los resultados experimentales. Glotova (5) halla que el método intramuscular no es práctico y aconseja el método intravenoso.

Para comparar los resultados obtenidos por el método soviético con los hallados por el método internacional es necesario dividir los resultados obtenidos por 3,5.

Un suero antioedematiens para uso terapéutico, debe dosar 1000 unidades francesas o 100 unidades internacionales.

IV. — Estandardización del suero antihistolyticum.

La Comisión Permanente de Patronización Biológica reunida en Copenhague en Noviembre de 1932 decidió establecer un patrón de suero antihistolyticum, basado en los mismos principios seguidos anteriormente para la preparación del suero antiperfringens.

Existiendo dos unidades: una francesa preconizada por Weinberg y otra alemana preconizada por Schmidt los dosages demostraron que 1 unidad francesa equivalia a 3 unidades alemanas.

Por razones de orden práctico fue recomendado por el "Statens Serum Institut" (17) que fuese adoptada como patrón internacional la unidad francesa.

1 unidad internacional es igual a 3 unidades alemanas e igual a 1 unidad francesa.

La Comisión recomienda (8) que la preparación seca y estable de suero antihistolitico del "Statens Serum Institut" de Copenhague sea adoptada como patrón internacional y que como unidad internacional sea adoptada la unidad antihistolítica de Weinberg. El equivalente de esta unidad internacional es la actividad antitóxica específica ejercida por 0.357 mgs de preparación seca y estable de suero antihistolitico del "Statens Serum Institut" de Copenhague.

El suero antihistolitico puede ser dosado de acuerdo con la técnica de Walbum y Reymann.

Esta nueva unidad fue aprobada por el National Institue of Health de Washington (4) y adoptada oficialmente desde el 1.° de Noviembre de 1936.

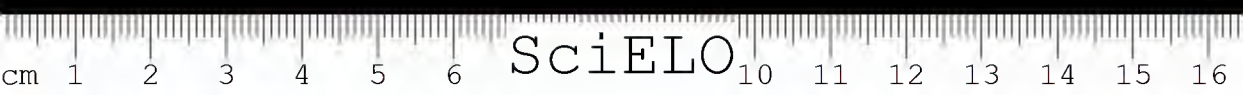
El método de dosage internacional del suero antihistolitico es análogo al método soviético. No se diferencia sino en el valor de la unidad antitóxica: 1 c.c. de suero patrón soviético (como todos los otros sueros patrónes soviéticos) contiene 1 unidad antitóxico y no 5 unidades antitóxicas como en el patrón internacional. Asi 1 unidad antitóxica soviética es 5 veces mayor que 1 unidad internacional. Para conocer pues el poder antitóxico de un suero soviético en unidades internacionales es necesario multiplicar su título por 5.

El método internacional da gran precisión en los dosages de sueros antihistoliticos. El test-dosis de las toxinas histoliticas puede ser avaluada con gran precisión sea con suero patrón francés, sea con suero patrón dinamarqués.

Weinberg y Guillaumie (22) determinando el título antitóxico de un suero antihistolitico usando test-dosis de diferentes toxinas histoliticas obtuvieron resultados que no diferían en más de 15 %.

Un suero histolítico para uso terapéutico debe dosar 250 unidades francesas que corresponden a 250 unidades internacionales.

. . . .

Provisioriamente se puede admitir como mínimo de dosage para los diferentes sueros antigangrenoso:

100 unidades antitóxicas internacionales pertringens por c.c.

125 unidades antitóxicas internacionales antioedematis maligni (vibrón séptico) por c.c.

100 unidades antitóxicas internacionales antiodematiens por c.c.

250 unidades antitóxicas internacionales antihistolyticum por c.c.

BIBLIOGRAFIA

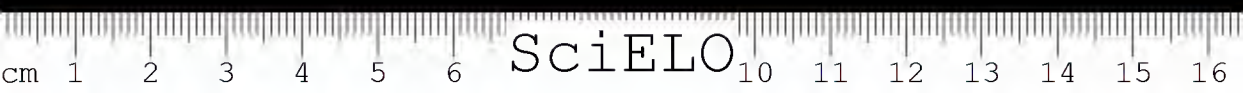
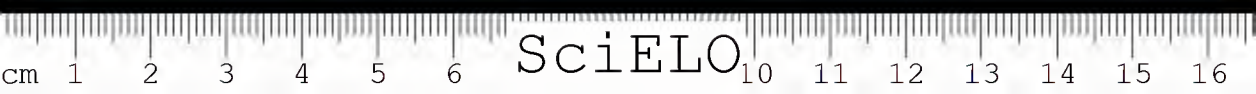
1. *Bengtson, J. A.* — Rapport de la Comission Permanente de Standardisation Biologique. C. H. C. P. S. **31**: 23. 1931.
2. *Bengtson, J. A.* — "The Official United States and International Unit for Standardizing gas gangrene antitoxin (vibrion septique)" Public Health Reports **49** (52): 1567.1934.
3. *Bengtson, J. A.* — "The Official United States and International Unit for Standardzing gas gangrene antitoxin (Oedematiens)" Public Health Reports **51** (11): 266. 1936.
4. *Bengtson, J. A.* — "The Official United States and International Unit for standardizing gas gangrene antitoxin (histolyticus)" Public Health Reports **51** (37): 1263. 1936.
5. *Glotova. H. W.* — "Etude Comparée des serums étalons antigangréneux internacionaux et sovietiques". An. Inst. Pasteur **59** (5): 526. 1937.
6. *Hartley, P.* — "Recherches internationales relatives a l'adoption d'un etalon pour le serum antigangréneux (Perfringens) et la definition d'une unité calculée par rapport a cet étalon". — Rapport de la Comission Permanente de Standardization Biologique. C. H.| C. P. C.|31.
7. *Hartley, P. y White, B P.* — "Memorandum sur un étalon international pour le serum antivibrion septique". Bull. Trimet de l'Organis. d'Hygiene. Numero special: 33. 1935.
8. *Jensen,* Cl. — "Etalon internacional proposé pour le serum antihistolitique". Bull. Trimet de l'Organis d'Hygiene **5**: 720. 1936.
9. *Jensen, Cl.* — "Rapport sur les étalons biologiques internationaux conservés an Statens Serum Institut pour le Compte de l'Organisation d'hygiene de la Societe des Nations". Bull. Trimest. de l'Organizat. d'Hygiene **5**: 790. 1926.
10. "Memorandum on the Standard for gas gangrene antitoxin (perfringens) and its aplication" — Permanent Commission on Biological Standardisation — League of Nations C. H.| C. P. S. B.|23. Geneve. 1935.
11. *Prigge. R.* — "Ueber Wirksamkeit und Antitoxingehalt de Gasbrandseruns". Deut Med. Wochensc. **63** (51): 1906. 1937.

11a "Vorschriften für die staatliche Prüfung der Gasbrand (Perfringens) Sera.. Ministerioblatt d. Reichs-und Preus Ministeriums des Innern. (15): 591. 1937.

12. "Serum antigangreneux (Perfringens)" — Rapport de la Commission Permanente de Standartisation Biologique C. H. **1056**: 5. 1931.
13. "Serum antigangreneux (vibrion septique)" — Rapport de la Commission Permanente de Standartisation Biologique — Bull. Trimet de l'Organis. d'Hygiene —
14. "Serums antigangreneux a) vibrion septique" — Rapport de la Commission Permanente de Standartisation Biologique — Bull. Trim. de l'Organis. d'Hygiene — Numero special: 1. 1935.

16. *Walbum, L. E. y Reymann, C.* — "Etalon internactional proposé pour le serum anti-oedematiens. Bull. Trim. de l'Organisat. d'Hygiene. Numero special: 42. 1935.
17. *Walbum, L. E. y Reymann, G. C.* — "Memorandun sur un étalon international pour le sérum anti-histolitique". Bull. trimet. de l'Organis. d'Hygiene **5**: 752. 1936.
18. *Weinberg, M., Davesne, J., y Prevot, A.* — "Recherches sur la standardisation des sérums antigangreneux. An. Inst. Past. **49** (4): 386. 1932.
19. *Weinberg, M., y Guillaumie, M.* — "Titres apparents et titres reels des serums anti-toxiques" — C. R. S. Biolog. **123** (31): 661. 1936.
20. *Weinberg, M. y Guillaumie, M.* — "Nouvelles recherches sur la titrage des serums antiperfringens". C. R. S. Biol. **126** (30): 656. 1937.
21. *Weinberg, M. y Guillaumie, M.* — Titrage des serums antitoxiques". Acad. Sciences **204** (12): 1012.
22. *Weinberg, M. y Guillaumie, M.* — "Titrage des serums antigangreneux (antiperfringens D, antihistolitique et anti Vibrion septique" — C. R. Biolog. **127** (12): 1084. 1938.

(Publicado tambem na Revista de Sanidad Militar da Republica do Paraguay *10*(91/94) :657 a 773. Julio a Octobre de 1938).

612.3932

O CAFÉ SOB O PONTO DE VISTA QUIMICO

6. Novo metodo para a determinação do acido clorogenico no café

POR

C. H. SLOTTA; C. NEISSER & A. CARDEAL

Em nosso primeiro artigo sobre a determinação do acido clorogenico contido no café (1), mostrámos a ineficiencia dos metodos descritos na literatura e passámos a descrever os estudos que fizemos, afim de descobrir um novo processo, afastando as dificuldades que se nos apresentavam. O primeiro obice consiste na extração completa do acido clorogenico do café; o segundo, no preparo, partindo dos extratos assim obtidos, de solutos finais puros, que sejam aproveitaveis para a determinação analitica; o terceiro, na inexistencia de meio satisfatorio de determinação do acido clorogenico.

Neste artigo podemos, felizmente, indicar como conseguimos solucionar completamente essas dificuldades, embora agindo, em quasi todos os casos, de modo diverso do que a principio supúnhamos.

A primeira das dificuldades apontadas, i. é., a extração completa do acido clorogenico, é facilmente afastada uma vez que se disponha de um metodo bastante sensivel para a determinação do acido clorogenico. Então, já não se necessitam mais de amostras de 10 gs. de café; 2 gs. são suficientes, o que naturalmente torna a extração mais rapida. Para êsse fim, utilizam-se saquinhos de linho, que se enchem com café, extraindo-se com agua, durante uma hora, num aparelho de Soxhlet. Como recipiente emprega-se um balão bem grande, visto que os solutos em forte ebulição formam muita espuma. Reconhece-se o final da extração pelo resultado negativo da reação de Hoepfner (2). No caso de não se dispor de um aparelho de Soxhlet, pode-se proceder à extração mediante repetidas fervuras do saco de linho com agua, em uma vasilha aberta.

A segunda dificuldade que consiste em preparar, desses extratos, solutos proprios para a determinação e com todo o acido clorogenico, mas livre, quanto

possivel, de outras substancias, foi removida do seguinte modo: precipita-se o extrato com acetato de chumbo, segundo o metodo anteriormente descrito; centrifuga-se e lava-se o precipitado. Reunem-se, então, o soluto e as aguas de lavagem, aproveitando-se para a determinação da trigonelina, sobre a qual ainda trataremos em um proximo trabalho. O percipitado de chumbo é desdobrado em suspensão aquosa com hidrogenio sulfurado, passando-se em seguida o soluto, conjuntamente com o sulfureto de chumbo, quantitativamente para um balão volumetrico; completa-se até a marca e filtra-se. No caso de café crú, o soluto é ligeiramente amarelo, e pardacento no de café torrado. Outros acidos, especialmente acido cafeico e acido acetico e provavelmente tambem acido citrico, estão contidos nesse soluto, como já tivemos ensejo de mostrar em nosso primeiro trabalho. No entanto, não é possivel determinar volumetricamente, nem mesmo mediante titulação potenciometrica, o acido clorogenico em um tal soluto muito diluido de pelo menos tres acidos organicos. Todas essas experiencias, nas quais em nosso trabalho anterior (1) tinhamos depositado grandes esperanças, e que nos custaram muito tempo e trabalho, infelizmente não tiveram resultados satisfatorios.

Neste caso surgiu em nosso auxilio um processo analitico, fundamentalmente novo, que permite determinar com exatidão, tanto o acido clorogenico, como o acido cafeico, sem a interferencia dos demais acidos organicos. Tivemos, pois, a surpresa de verificar *que o acido clorogenico e o acido cafeico em soluto alcalino podem ser titulados exatamente com 10 atomos de iodo*. Trata-se neste caso de um desdobramento oxidativo da molecula pelo hipo-iodeto. Observa-se, trabalhando com soluto devidamente concentrado, depois de um certo tempo, o aparecimento de um precipitado cristalino e amarelo, que pudemos identificar como iodoformio. Pelo hipo-iodeto provoca-se uma destruição profunda da molecula de acido clorogenico. Em vista de tambem o acido cafeico reagir com iodo na mesma proporção de 1:10, deduz-se que a destruição da molecula provavelmente se dá na parte aromatica, que é comum aos dois acidos. Estamos fazendo estudos sobre o mecanismo desta reação, os quais relataremos mais tarde.

É claro que estudamos minuciosamente as condições da reação de acido clorogenico purissimo com iodo em excesso em soluto alcalino. A reação não se dá imediatamente, terminando, porém, depois de mais ou menos meia hora (Experiencia No. 1). Depois de adicionados iodo e alcali, é aconselhavel esperar cerca de uma hora antes de se acidular e de se titular o excesso de iodo com tiosulfato. Recomenda-se deixar o soluto durante êsse tempo no escuro; como é em geral aconselhavel para as reações com hipo-iodeto. Depois da acidulação, convem, afim de evitar perda de iodo, proceder imediatamente a titulação, cujo ponto final é facilmente visivel, como em geral ocorre depois da adição de amido. Para nós foi de capital importancia o fato de ser tão nitido o final da titulação, tanto nos solutos finais fortemente coloridos de café torrado,

como nos solutos preparados de café crú ou de acido clorogenico puro. Desde que o excesso de iodo ou de hipo-iodeto, por maior que seja, não influi na precisão da determinação (Experiencia No. 2), deve-se evitar o emprego de excessos pequenos demais de solutos de iodo. Além dos acidos clorogenico e cafeico, tambem o sal complexo de clorogenato de potassio e cafeina reage com iodo numa proporção de 1:10; por isso, executámos nossas experiencias em parte com essa substancia, que é mais accessivel (Experiencia No. 1b).

Essa nova titulação dos acidos clorogenico e cafeico é muito exata, o que se explica pelo fato de 1 molecula de acido consumir 10 atomos de iodo e de a titulação de iodo com tiosulfato pertencer aos metodos analiticos mais precisos. Portanto, é possivel com o emprego de solutos de titulação N/20 analisar ainda quantidades de apenas 10 mgs. de acido clorogenico com a maior exatidão (Experiencia No. 3b). Mais favoravel é, naturalmente, titular uns 20 a 30 mgs. de acido clorogenico, contidos em 0,5g. de um café medio. Em nossas analises partimos, com maior vantagem, de uma quantidade quatro vezes maior, afim de não termos que esperar pela filtração quantitativa, tanto mais quanto, como mais tarde se verá, executamos duas dessas titulações.

E' claro que a principio obtemos aquela quantidade de iodo, consumida pelos acidos clorogenico e cafeico contido no café. Como desses dois acidos apenas o acido cafeico é soluvel em eter, pode-se êste facilmente afastar de uma parte aliquota da mistura e em seguida titular o acido clorogenico sosinho na camada aquosa. Da diferença de ambas as titulações calcula-se, de um modo muito simples, o teor do acido cafeico contido no café. A unica precaução que deve ser observada, é que o eter empregado esteja completamente livre de peroxidos, pois, extraindo-se agua pura com eter comum e expulsando-se então completamente o eter da agua, ao titular-se esta agua com iodo em soluto alcalino, verifica-se que o consumo de iodo está bem além do limite de erro (Experiencia No. 4).

Desde que a titulação dos acidos clorogenico e cafeico pelo nosso processo possúi um limite de erro muito pequeno (Experiencia No. 3a), é natural que a separação desses dois acidos, mesmo com eter purissimo, não seja tão exata (Experiencia No. 5). Os valores para o acido clorogenico estão um pouco altos. Essa diferença do verdadeiro valor para os estudos comparativos seriados, por nós propostos, de diferentes tipos de cafés é insignificante, visto que em todas as analises ela aparece em igual proporção.

Os resultados que até agora colhemos com uma serie de cafés e que serão relatados, em pormenor, mais tarde, provam quão necessario era o descobrimento de um novo metodo, que, na determinação de acido clorogenico, merecesse verdadeira confiança e que fosse de facil manejo. Êsses resultados provam que todos os metodos até então conhecidos para a determinação de acido clorogenico no café crú e especialmente no café torrado davam resultados erroneos. Me-

diante o novo metodo nos é possivel, não só analisar um grande numero de cafés diferentes em estado crú e torrado, como tambem determinar o teor de acido clorogenico nas bebidas de café e fazer estudos sobre a influencia da torrefação sobre o teor de acido clorogenico. Êsses estudos, completados especialmente pelas pesquisas feitas na Secção de Fisio-patologia do Instituto, tornam-se cada vez mais interessantes.

Normas para a determinação do acido clorogenico no café crú (A), no torrado (B) e na bebida (C).

1. A e B. Determina-se a *humidade* numa amostra de 10 gs..

2. A. Extraem-se, primeiramente com eter de petroleo e em seguida com cloroformio, 10 gs. de café muito bem moido; o café assim *desengordurado e isento de cafeina*, é pesado depois de seco.

3. A. Pesa-se a quinta parte do café desengordurado, o que corresponde a 2,0 gs. de café crú, dentro de um saquinho de linho.

B. Pesam-se exatamente 2 gs. de café torrado em um saquinho de linho.

A e B. Deita-se o saquinho num aparelho de Soxhlet, cujo recipiente tenha pelo menos uma capacidade de 500 ccs. e no qual já estejam 100 ccs. de agua. Procede-se então a uma energica extração durante uma hora. Retira-se em seguida o saquinho do aparelho, expreme-se o liquido porventura ainda nele contido dentro de um tubo de ensaio e prova-se então com a reação de Hœpfner.

> **(Reação de Hoepfner:** Acidula-se fracamente o soluto com acido acetico; em seguida, adicionam-se algumas gotas de um soluto de nitrito de sodio ajuntando imediatamente algumas gotas de soda caustica para alcalinizar: uma coloração vermelha indica a presença de acido clorogenico).

Si a extração foi perfeita, a reação de côr é completamente negativa. No caso contrario, tem-se que continuar a extração.

Depois de resfriar, transfere-se o soluto para um copo de centrifugador e precipita-se, misturando bem com 2 ccs. de um soluto saturado de acetato de chumbo. Agora, centrifuga-se até que o precipitado se haja depositado, deixando-se o soluto claro, o que em geral dura 10 minutos. Retira-se e guarda-se o soluto. O precipitado é misturado bem com um pouco de agua e novamente centrifugado; a agua de lavagem é ajuntada ao primeiro soluto. Repete-se mais duas vezes estas lavagens, reunindo todas as aguas de lavagem ao soluto original. Depois da primeira centrifugação, é conveniente certificar-se, pela adição de um pouco de acetato de chumbo, si no soluto claro não ha mais formação

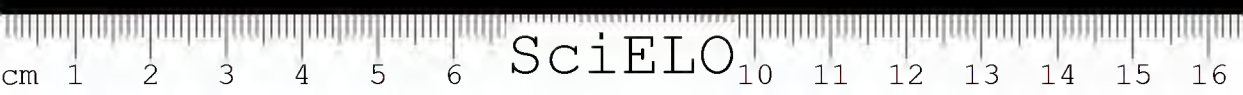
de precipitado. Os liquidos decantados reunidos serão usados para *a determinação da trigonelina.*

Em seguida o precipitado é transferido quantitativamente para um copo de Becher com o menos possivel de agua, aquecido à ebulição, fazendo-se passar durante meia hora uma corrente não muito lenta de hidrogenio sulfurado. Durante todo o tempo, o soluto deve estar fervendo, sendo conveniente amassar as particulas mais grosseiras do precipitado com um bastão de vidro, durante a passagem do gas. No caso do café crú, já depois de no maximo 10 minutos, desaparece a ultima particula amarela; mesmo assim, deve-se continuar a passar gas, fervendo e misturando bem o soluto durante mais 20 minutos. Desliga-se então a corrente de gas e ferve-se durante alguns minutos, afim de expulsar o hidrogenio sulfurado em excesso.

O soluto ainda quente, juntamente com o precipitado de sulfureto de chumbo, é transferido quantitativamente para um balão graduado de 100 ccs., em seguida lavando bem o copo e juntando as aguas de lavagens ao liquido no balão. Depois de bem resfriado, completa-se o volume do balão até a marca (caso se haja formado espuma no gargalo do balão, pode-se destruir esta por meio de apenas uma gota de alcool); em seguida agita-se bem o conteudo e filtra-se por um filtro de dobras, devendo o filtrado aparecer perfeitamente claro. Certifica-se da ausencia de chumbo no filtrado, provando uma pequena amostra em um tubo de ensaio com hidrogenio sulfurado. No caso de se tornar turvo o soluto ou houver até precipitado, lava-se bem o precipitado de sulfureto de chumbo sobre o filtro, no minimo 10 vezes, com agua quente, e trata-se todo o filtrado, junto com as aguas de lavagem, novamente com hidrogenio sulfurado em um copo, como acima ficou indicado. Do soluto assim obtido retiram-se exatamente 25 ccs. para a "*Titulação do acido clorogenico + acido cafeico*".

Esta titulação faz-se do seguinte modo: tratando-se de café crú, adicionam-se ao liquido 30 ccs. de soluto de iodo N/20 e, tratando-se de café torrado, apenas 25 ccs. de soluto; em seguida agitando-se bem, cerca de 30 gotas de soda caustica 2 N. Cobre-se com um vidro de relogio e deixa-se repousar durante 50 minutos no escuro. Depois, acidula-se com cerca de 2,5 ccs. de acido sulfurico 2 N e titula-se, agitando bem com soluto N/20 de tiosulfato, adicionando, finalmente, algumas gotas de um soluto de amido a 1%.

Calculo: Multiplica-se o fator do soluto de iodo por 30 e 25, respectivamente, subtraindo-se deste valor o numero de centimetros cubicos de soluto de tiosulfato exatamente N/20 e anota-se este resultado, que corresponde ao gasto de soluto de iodo N/20 para acido clorogenico + acido cafeico.

Outros 50 ccs. do filtrado são extraidos num extrator para liquidos durante 4 horas com eter destilado, livre de peroxidos. Depois, coloca-se a camada aquosa junto com as aguas de lavagem num Kitasato, introduz-se um capilar e expele-se o eter no vacuo, sendo conveniente mergulhar finalmente o Kitasato,

por poucos momentos, num banho-maria fervente. Deixa-se resfriar e transferem-se o soluto e as aguas de lavagem para um balão volumetrico de 100 ccs. e completa-se até a marca. Desse soluto empregam-se 50 ccs. para a *titulação do acido clorogenico*:

Procede-se à titulação como acima ficou descrito, empregando, porém, só 25 ou 20 ccs., respectivamente, do soluto de iodo N/20. Por um calculo analogo obtem-se o numero de ccs. de soluto N/20 de iodo, gastos pelo acido clorogenico contido no soluto. Multiplicando-se este numero por 1,77 obtem-se a quantidade de acido clorogenico em miligramas. Como esta quantidade corresponde a 0,5 gs. de café, tem-se que multiplicar por 0,2 para saber a percentagem de acido clorogenico no café. Finalmente, para referir o resultado ao café seco, é mister dividi-lo por (100-% de humidade).

Exemplo: Foram adicionados 25 ccs. de soluto de iodo com fator f=1.015; isto corresponde a 25,37 ccs. de soluto de iodo exatamente N/20; o gasto em soluto de tiosulfato exatamente N/20 era de 9,32 ccs.; portanto, o acido clorogenico consumiu 25,37 — 9,32 = 16,05 ccs.. Multiplicando-se 16,05 por 1,77, obtem-se o valor de 28,4 mgs. para acido clorogenico contido em 0,5 gs de café. Isto corresponde a 5,68%.

Si o café continha 11,2% de humidade, deve-se ainda dividir por 100—11,2=88,8, obtendo-se assim: 6,40% de acido clorogenico no café seco.

C. *Na bebida* — A determinação é feita de tal modo, que se precipita um volume exatamente medido com acetato de chumbo, continuando-se depois como foi indicado acima para o café crú e torrado. A quantidade de bebida necessaria para a determinação depende, naturalmente, da quantidade de acido clorogenico que se espera obter, portanto, da concentração da bebida. No café, preparado à moda brasileira, a quantidade mais favoravel é de 10 ccs., que, em media, contém cerca de 100 mgs. de acido clorogenico; no soluto final deve-se titular 25 mgs., o que corresponde a um consumo de cerca de 14 ccs. de solução de iodo N/20. — *Nota*: Não é necessaria a retirada das gorduras e da cafeina antes da determinação.

4. *Calculo do acido cafeico.*

(No café crú, torrado e na bebida).

Na determinação do acido clorogenico obtem-se primeiro o gasto de iodo para acido clorogenico + acido cafeico, e, na determinação seguinte, o gasto só para o acido clorogenico. A diferença multiplicada por 0,9 fornece o teor de acido cafeico em miligramas, que precisa ser multiplicado por 0,2, para dar o teor percentual de acido cafeico. Este, por sua vez, pode ser referido ao teor no café seco, tomando-se em consideração o respectivo teor em humidade.

Exemplo: O gasto em iodo, para acido clorogenico + acido cafeico, foi de 20,54 ccs. e para acido clorogenico só (depois da extração com eter)

de 16,48. A diferença=4,06 é multiplicada por 0,9, dando 3,65 mgs. de acido cafeico ou sejam 0,73%. Si o café continha 11,2% de humidade então deve-se dividir por 88,8. O resultado é: 0,82% de acido cafeico no café seco.

Descrição das experiencias

Experiencia No. 1 — Dependencia entre consumo de iodo e tempo.

a) Em cada experiencia: 10,75 mgs. de acido cafeico, 20 ccs. de soluto de iodo N/20 com f=0,771 e 1 cc. de alcali; depois de varios periodos, acidulação com acido sulfurico diluido e titulação com soluto de tiosulfato exatamente N/20.

Tempo em minutos	Consumo de iodo em atomos por mol. de acido cafeico
3	7,90
6	8,55
10	9,25
15	9,30
30	9,50

O acido cafeico empregado não estava completamente puro; porisso, o teor teorico de 10,0 atomos de iodo, mesmo depois de 30 minutos, não foi inteiramente alcançado.

b) Em cada experiencia: 40,0 mgs. de clorogenato de potassio mais cafeina, 20 ccs. de soluto de iodo N/20 de f=1,015, e 1 cc. de alcali; acidulação e titulação depois de diversos periodo de tempo.

Tempo em minutos	Consumo de iodo em atomos por mol. de potassio e cafeina
10	8,92
20	9,64
30	9,65
45	10,08
60	9,82

c) Em cada experiencia: 21,3 mgs. de acido clorogenico, em 20 ccs. de um soluto de iodo N/20 de f=0,771 e 1 cc. de alcali. Acidulação e titulação depois de diversos periodos de tempo.

Tempo em minutos	Consumo de iodo em atomos por mol. de acido clorogenico
0	6.60
5	8,90
10	9,20
20	9.50

Experiencia No. 2 — Independencia entre consumo de iodo e excesso de iodo.

Em cada experiencia, 21,3 mgs. de acido clorogenico foram tratados com quantidades crescentes de iodo e alcali, sendo acidulados e titulados depois de 20 minutos.

Quantidade de iodo em cc.	Consumo de iodo em atomos por mol. de acido clorogenico
20 cc	9,50
30 cc.	9,50
40 cc.	10,15

Experiencia No. 3 —

a) Analises de acido clorogenico puro, sendo quantidades desconhecidas ao analista.

Dados	Encontrados
31,2 mgs.	29,9 mgs.
10,7 mgs.	12,1 mgs.
15,4 mgs.	15,0 mgs.

b) Analise de uma quantidade reduzida de acido clorogenico.

Dado: 8,5 mgs. Achado: 8,0 mgs.

Experiencia No. 4 — Influencia do eter empregado na extração sobre o consumo de iodo na camada aquosa.

Agitou-se agua com eter comum, separou-se-a e o eter foi completamente expulsado da agua pela devida aeração. Na titulação subsequente com iodo, em soluto alcalino, consumiram-se mais ou menos 2 ccs. de soluto de iodo N/20.

O ensaio foi novamente feito com eter livre de peroxidos e cuidadosamente destilado.

Consumo: 0,37 cc. de soluto de iodo N/20.

Experiencia No. 5 — Separação dos acidos clorogenico e cafeico.

19,2 mgs. de acido clorogenico e 7.0 mgs. de acido cafeico em soluto aquoso foram extraídos durante 4 horas num aparelho com eter livre de peroxidos. A titulação na camada aquosa acusou 21,5 mgs. de acido clorogenico.

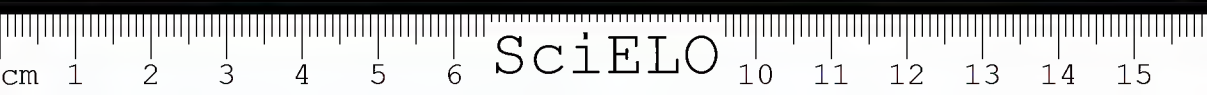
Em um ensaio analogo, em vez dos 20,0 mgs. de acido clorogenico obtiveram-se 22,2 mgs.. O teor para o acido cafeico calculado da diferença da titulação antes e depois da extração com eter era de 5,8 mgs., enquanto que a quantidade original era de 6,0 mgs..

RESUMO

Afim de elaborar um metodo suficientemente exato e ao mesmo tempo adaptavel a doseamentos em serie, havia tres problemas a resolver:

1. Extração completa do acido clorogenico do café. Foi conseguida com o emprego de quantidades bastante pequenas (2 gs.), por extração com agua, durante 1 hora, num aparelho Soxhlet.

2. Preparo de solutos finais os mais puros possiveis. Por precipitação do extrato com acetato de chumbo, decomposição do precipitado com hidrogenio sulfurado e extração do filtrado com eter, obtiveram-se solutos finais quasi incolores no caso do café crú e levemente pardos no caso do café torrado. O grau de pureza era bem o suficiente para a determinação subsequente.

3. A possibilidade de doseamento de quantidades, mesmo pequenas, de acido clorogenico. Verificou-se que o acido clorogenico em soluto alcalino reage exatamente com 10 atomos de iodo, o que representava um metodo de doseamento do acido clorogenico extremamente simples e muito exato. Esse metodo é descrito minuciosamente no texto.

ZUSAMMENFASSUNG

Um eine genügend genaue, zu Reihenanalysen geeignete Bestimmungs-methode für Chlorogensäre auszuarbeiten, waren 3 Probleme zu lösen:

1. Die vollständige Extraktion der Chlorogensäure aus dem Kaffee. Sie gelingt bei Anwendung genügend kleiner Mengen (2g) durch 1-stündige Extraktion im Soxhletapparat mit Wasser.

2. Die Herstellung möglichst reiner Endlösungen. Durch Fällung des Extraktes mit Blei-acetat, Zerlegung des Niederschlages mit Schwefelwasserstoff und Aether-Extraktion des Filtrates orhält man bei Rohkaffee fast farblose, bei Röstkaffee hell braun-gelbe Endlösungen, deren Reinheit für die folgende Bestimmung voll ausreichend ist.

3. Die quantitative Erfassung selbst kleiner Mengen Chlorogensäure. Es wurde die Tatsche gefunden, dass Chlorogensäure in alkalischer Lösung mit genau 10 Atomen Jod reagiert, womit eine überaus einfache und sehr genaue Bestimmungsmethode für Chlorogensäure gegeben ist. Die ausführliche Arbeitsvorschrift wird veröffentlicht.

BIBLIOGRAFIA

1. *Slotta, C. H.; Neisser, C. & Cardeal A.* — Rev. Inst. Café — 12:2006. 1937.
2. *Hoepfner, W.* — Chem. Ztg. 56:991. 1932.

(Trabalho da Secção de Quimica e Farmacologia Experimental do Instituto Butantan, recebido para publicação em maio de 1939. Dado à publicidade em Junho de 1939).

612.3932

O CAFÉ SOB O PONTO DE VISTA QUIMICO

7. Novo metodo para a determinação da trigonelina

POR

C. H. SLOTTA & C. NEISSER

Em nosso trabalho anterior (1), descrevemos para a determinação do acido clorogenico no café crú e torrado um novo metodo, cuja grande exatidão nos permite partir de apenas 2 gs. de café em pó, ou então 10 ccs. de bebida. É claro que envidámos esforços afim de abranger, o quanto possivel, nessa diminuta quantidade de substancia, ainda outros produtos para os quais até então ainda não existia metodo de determinação analitica. Em primeiro logar, focalizamos nosso interesse sobre a trigonelina, a qual, depois da cafeina, representa o alcaloide mais importante do café.

A presença da trigonelina no café é conhecida de ha muito (2), embora sua absoluta identificação com a trigonelina preparada sinteticamente tivesse sido possivel apenas alguns anos atrás (3). As analises realizadas por Nottbohm & Mayer (4,5) foram as que em primeiro logar nos indicaram a quantidade da trigonelina contida no café, mas seu metodo não é completamente satisfatorio. Para os fins a que nos propunhamos, esse metodo já não era o apropriado, visto que ele partia de quantidades de 20 gs. de café. Além disso, requeria uma autoclava que certamente não existe em todos os laboratorios; e de analises em serie, que desde o principio visavamos fazer, nem poderiamos cogitar, pois era êle muito demorado e exigia simultaneamente exames comparativos com trigonelina pura.

Segundo as analises de Nottbohm & Mayer (5), existiriam 0,4% de trigonelina no café crú. Em nossa amostra de 2 gs., portanto, deviamos contar com 8 mgs. de trigonelina. Nesse caso, mais que no do acido clorogenico, seria necessario encontrar um metodo microanalitico, que fosse capaz de determinar uma quantidade tão diminuta de trigonelina. Felizmente verificamos que a *trigone-*

lina em soluto alcalino pode ser titulada com exatamente 10 atomos de iodo. Esse novo metodo ultrapassa bastante as nossas exigencias quanto à exatidão: permite o doseamento, com a necessaria exatidão, de quantidades apenas de 2 mgs. (Experiencia No. 1). Baseados nisso, foi-nos possivel determinar, no decurso de nossas analises, a trigonelina mediante o emprego da mais exata e mais simples de todas as titulações, a titulação pelo iodo.

Faltava agora apenas resolver o problema de obter a trigonelina do café em solutos bem puros e livres de substancias secundarias. Tambem isto foi solucionado. Na precipitação do acido clorogenico com acetato de chumbo, a trigonelina permanece no soluto. O soluto depois de retirado o chumbo mediante o emprego de hidrogenio sulfurado, é quasi incolor no café crú, e ligeiramente amarelado no café torrado e na bebida. Pode-se agora proceder à titulação do iodo numa parte aliquota de soluto, e depois, em uma outra parte de soluto, determinar a glicose redutora segundo Bertrand e calcular o teor de trigonelina pela diferença (Experiencia No. 2). Já que esse metodo, como todos os baseados no calculo por diferenças, está sujeito a naturais inexatidões, achamos conveniente procurar um outro metodo para a separação direta da trigonelina.

Tambem este problema teve solução feliz. Verificámos que a determinação da trigonelina pode ser realizada por precipitação pelo acido fosfo-tungstico. Isto se consegue facilmente, mesmo em solutos muito diluidos, como os que obtemos em nossas analises, uma vez que se tome em consideração o seguinte: 1. A precipitação dá-se unicamente em meio acido; 2. o precipitado somente se torna filtravel, si se adiciona ao soluto, a frio, acido fosfo-tungstico, aquecendo até solução clara e deixando esfriar *muito lentamente;* 3. o composto de trigonelina e acido fosfo-tungstico, tampouco, não é completamente insoluvel em soluto acido: em volume de 110 ccs. permanecia dissolvida uma quantidade do composto, que correspondia a 1,0 mgs. de trigonelina (Experiencia No. 3). Esse fator empirico deve ser acrescentado à quantidade de trigonelina achada.

Com o emprego da precipitação com acido fosfo-tungstico o nosso processo para a determinação da trigonelina no café se torna extremamente simples e exato. O soluto livre de chumbo é acidulado e precipitado com acido fosfo-tungstico do modo descrito. O precipitado é filtrado e dissolvido no filtro com soda caustica diluida. Adiciona-se a êsse soluto alcalino uma quantidade medida de soluto de iodo, deixa-se repousar uma hora, acidula-se em seguida, titulando o excesso de iodo com tiosulfato. Convencemo-nos de que a presença do acido fosfo-tungstico no soluto não inflúi sobre a titulação da trigonelina pelo iodo.

Desde a elaboração do metodo, já realizamos dezenas de analises, que, sem exceção, coincidiram, dentro do limite estrito, com a prova de controlo (Experiencia No. 4). Com o emprego desse metodo tão extremamente simples, que está ao alcance de qualquer auxiliar de laboratorio pouco pratico, cuja realização

não leva mais que um dia, tornou possivel analisar inumeras amostras de café quanto ao seu verdadeiro teor de trigonelina.

Faremos em breve uma comunicação sobre os resultados. De antemão queremos adiantar que o teor de trigonelina no café crú é muito mais elevado, do que até então se supusera: em media 1%! Na torragem, grande parte da trigonelina é destruida, de modo que o café torrado contem apenas uma media de 0,5% de trigonelina. Nossas analises revelaram, além disso, que o conceito expresso por Nottbohm & Mayer (7) sobre o "indice de alcaloides", i. é., relação da cafeina para a trigonelina, requer uma revisão meticulosa, visto que este indice está baseado sobre uma determinação incorreta da trigonelina.

Tecnica para determinação da trigonelina
(O café crú, café torrado e bebida)

Os liquidos reunidos, decantados da precipitação de chumbo combinado com o acido clorogenico (Vide tecnica para doseamento do acido clorogenico, Mem. Inst. Butantan *12*. 1938), são aquecidos num copo sobre a chama até a ebulição, fazendo-se passar, ao mesmo tempo, uma corrente de hidrogenio sulfurado durante meia hora. Convém reparar que, no final desta operação, o volume do liquido seja mais ou menos de 150 ccs.. Após a passagem do hidrogenio sulfurado, deixa-se ainda ferver durante algum tempo, afim de expulsar os residuos do hidrogenio sulfurado. Filtra-se, ainda quente, em um balão volumetrico de 200 ccs.. Lava-se varias vezes o filtro, completando o balão volumetrico até a marca, depois de esfriado. Retiram-se então 100 ccs., despejando-os em um balão de Erlenmeyer de boca larga de 200 ccs.. Adiciona-se 10 ccs. de acido sulfurico (2 N) e 40 gotas de um soluto a 10% de acido fosfo-tungstico. O soluto turvo é aquecido até o ponto de ebulição, com o que o soluto fica completamente claro. Deixa-se então esfriar *lentamente*, pondo-o finalmente na geladeira. Num funil analitico prepara-se um filtro em otimo estado de funcionamento, humedece-se com acido sulfurico N/2 e filtra-se o soluto esfriado. Convém ter o devido cuidado para evitar que a menor quantidade possivel do precipitado seja levada ao filtro. Lava-se então duas vezes com 5 ccs. de acido sulfurico N/12, tomando-se novamente o cuidado de levar a menor quantidade possivel do precipitado ao filtro. Então coloca-se o funil sobre o vasilhame, no qual se acha a maior quantidade do precipitado. Deitam-se então no fitro 10 ccs. de soda caustica 1/N divididos em duas porções, com que se dissolve o precipitado do filtro. Lava-se varias vezes o filtro com agua fria, procedendo-se então á determinação da trigonelina no soluto assim obtido por meio da titulação de iodo.

Para êsse fim, acrescentam-se ao soluto 20 ccs. de soluto de iodo N/20, cobre-se o copo com um vidro de relogio e deixa-se repousar no escuro du-

rante uma hora. Acidula-se enão com 7 ccs. de acido sulfurico 2/N e titula-se o excesso com um soluto de tiosulfato N/20, adicionando-se, finalmente, amido. Calculo: O numero de ccs. consumidos de soluto N/20 de iodo obtém-se do modo usual. Multiplicando-se este numero por 0,69, obtém-se o numero de mgs., contidos nos 100 ccs. de soluto (=1,00 g. de café). Adiciona-se, então a esse numero 1,00 mg., pois esta quantidade permanece nos liquidos empregados e foge, portanto, à titulação. Divide-se então por 10, para obter o teor porcentual da trigonelina. Calcula-se então o valor de referencia ao café sêco, dividindo-se por (100—% de humidade).

Exemplo: Adicionaram-se 20 ccs. de um soluto de iodo de um fator f=1.020; isto corresponde a 20,40 ccs. de um soluto N/20 de iodo. O consumo em tiosulfato foi 9,58 ccs.. O consumo em iodo do soluto foi, portanto, de 10,82 ccs.. Isto multiplicado por 0,69 dá 7,46 mgs. de trigonelina. Adiciona-se então 1,00 mg.; obtendo-se como resultado 8,46 mgs. ou seja de 0,85%. O café empregado continha 10,0% de humidade; o teor em trigonelina no café sêco é, portanto, de 0,94%.

Descrição das experiencias

Experiencia No. 1 — Doseamento de hidrocloreto de trigonelina puro com iodo em soluto alcalino. Os valores obtidos são calculados sobre a base de um gasto de 10 atomos de iodo para molecula de trigonelina

No.	mg. hidrocloreto de trigonelina	
	dados	achados
1	10,7	10,0
2	10,7	10,4
3	10,7	10,3
4	10,7	10,4
5	10,7	10,5
6	4,27	4,17
7	4,27	4,09
8	11,4	10,8
9	4,05	4,02
10	2,14	2,08
11	2,14	2,09

Experiencia No. 2 — Doseamento indireto da trigonelina em presença de glicose. A glicose foi titulada segundo Bertrand. A titulação da mistura com iodo em soluto alcalino deu o valor para a soma: gasto de iodo da

glicose (2 atomos de iodo por molecula) + gasto de iodo da trigonelina (10 atomos de iodo por molecula, calculando-se então os teores da trigonelina.

	mg. hidrocloreto de trigonelina		mg. glicose	
	dados	achados	dados	achados
mistura sintetica	6,98	6,66	5,40	5,57
	6,98	7,02	5,40	5,38
extrato dum café crú		1,21%		1,00%
		1,18%		1,00%
		1,20%		1,09%
		1,13%		1,08%

Experiencia No. 3 — Doseamento de hidrocloreto de trigonelina por precipitação com acido fosfo-tungstico e titulação com iodo.

A quantidade de hidrocloreto de trigonelina exatamente pesada foi dissolvida em 100 ccs. de agua e depois tratada segundo a tecnica acima descrita.

mg. hidrocloreto de trigonelina		diferença
dados	achados	mg.
7,8	6,55	1,25
10,1	8,5	1,6
20,4	19,2	1,3
15,0	13,9	1,1
9,8	8,53	1,27
		Media 1,30

Portanto, ficam dissolvidos na media de 1,30 mgs. de hodrocloreto de trigonelina ou seja 1,00 mg. de trigonelina, que escapa à titulação e tem que ser acrescentado no calculo.

Para controlo, foram analisadas duas amostras do mesmo café, a uma das quais foram adicionados 2,27 mgs. de hidrocloreto de trigonelina, ou seja 1,80

mgs. de trigonelina. A analise deu 8,97 e 10,67 mgs. de trigonelina, respectivamente. A diferença de 1,70 mgs. concorda bem com a quantidade adicionada.

Experiencia No. 4 — Exemplos de resultados, obtidos pelo novo metodo de doseamento da trigonelina.

Analises				
Tipo de café	1	2	3	4
Brasil crú	1.00	1.01	1,02	1,04
Franca crú	1.26	1.21	1,20	1,25
Franca torrado	0.62	0,63	0,62	
Costa Rica crú	1,06	1.06	1,05	
Java torrado	0.36	0.35	0,36	

RESUMO

A trigonelina em soluto alcalino consome exatamente 10 atomos de iodo, com o que se obtém um metodo quantitativo simples.

No decorrer do metodo de analise elaborado conseguiu-se a trigonelina, açucares redutores, como substancias consumidoras de iodo. O açucar pode ser determinado por um dos metodos correntes (p. ex., o de Bertrand), e a trigonelina pode então ser calculada pela diferença entre a titulação iodometrica e a determinação do açucar; melhor ainda é a precipitação da trigonelina em meio acido com acido fosfo-tungstico, o que a separa deste modo do açucar. Depois de dissolvido o precipitado do acido fosfo-tungstico em soluto de soda caustica, titula-se com iodo.

O novo metodo distingue-se pela execução rapida e pela alta precisão, mesmo em diminutas quantidades de trigonelina. Sua aplicação a uma grande variedade de tipos de café revelou o fato surpreendente de conter o café crú em media 1% e o café torrado 0,5% de trigonelina.

SUSAMMENFASSUNG

Es wird gezeigt, dass Trigonellin in alkalischer Lösung genau 10 Atome Jod verbraucht, womit eine einfache quantitative Bestimmungsmethode gegeben ist.

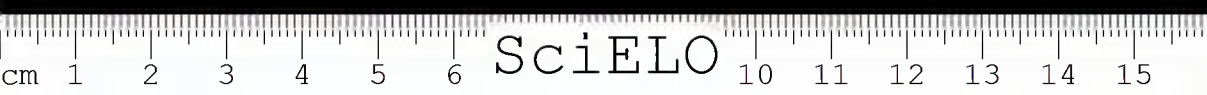
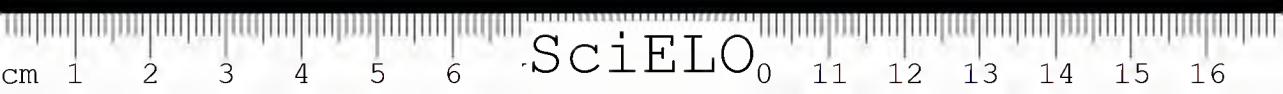
In dem ausgearbeiteten Analysengange wird das Trigonellin in sehr reinen Lösungen erhalten, die an jod-verbrauchenden Substanzen nur noch reduzierenden Zucker enthalten. Man kann nun entweder diesen Zucker nach einer der üblichen Methoden (z. B. Bertrand) bestimmen und dann das Trigonellin aus der Differenz der Jodtitration und der Zuckerbestimmung errechnen. Oder besser aber kann man das Trigonellin in saurer Lösung mit Phosphorwolframsäure fällen und auf diese Weise vom Zucker trennen. Nach Auflösung des Phosphorwolframsäure-Niederschlages in Natronlauge wird das Trigonellin mit Jod titriert.

Die neue Methode zeichnet sich durch schnelle Ausführbarkeit und hohe Genauigkeit selbst bei geringen Mengen Trigonellin aus. Ihre Anwendung auf eine grosse Zahl von Kaffeesorten führte zu dem überraschenden Resultat, dass im Rohkaffee durchschnittlich 1%, im Röstkaffee 0,5% Trigonellin enthalten sind.

BIBLIOGRAFIA

1. *Slotta, C. H.; Neisser, C. & Cardeal, A.* — Mem. Inst. Butanan **12**: 1938.
2. *Palladino, P.* — Atti R. Acad. dei Lincei Roma **3**(1):399. 1894.
   Graf, E. — Zschr. f. oeffentl. Chem. **10**:279.
   Polstorff, K. — Wallach-Festschrift :569. 1909.
   Gorter, K. — Liebigs Ann. Chem. **372**:239. 1910.
3. *Heiduschka, A. & Brüchner, R.* — J. prakt. Chem. **130**(2):11. 1931.
4. *Nottbohm, F. E. & Mayer, F.* — Zschr. Unters. Lebensm. **61**:202. 1931.
5. *Nottbohm, F. E. & Mayer, F.* — Zschr. Unters Lebensm. **63**:47. 1932.
6. *Nottbohm, F. E. & Mayer, F.* — Zschr. Unters. Lebensm. **63**:176. 1932.
7. *Nottbohm, F. E. & Mayer, F.* — Zschr. Unters. Lebensm. **61**:429. 1931.

(Trabalho da Secção de Quimica e Farmacologia Experimentais do Instituto Butantan, recebido para publicação em maio de 1938. Dado á publicidade em junho de 1939).

612.31412:615.94:598.122

ESTUDOS QUIMICOS SOBRE OS VENENOS OFIDICOS

4. Purificação e cristalização do veneno da cobra Cascavel

POR

C. H. SLOTTA & H. L. FRAENKEL-CONRAT

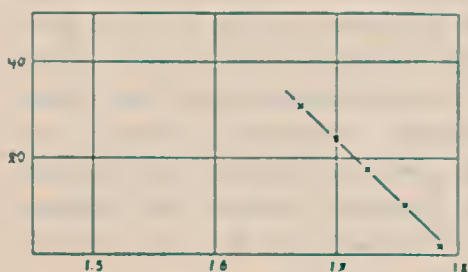
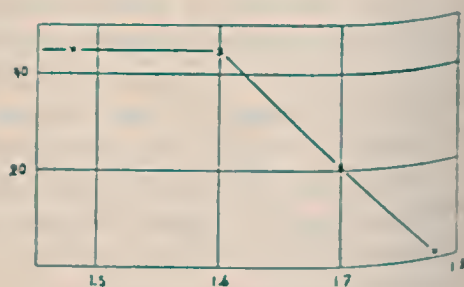
Quando iniciámos as experiencias sôbre o enriquecimento do veneno da serpente Cascavel (*Crotalus t. terrificus*), utilizamos da coleção do Instituto preparados já antigos, secados a uma temperatura de 37° e com um teor de toxicidade (1) de 1200 a 1700. Mediante varios metodos de coagulação e precipitação, conseguimos, com relativa facilidade, libertar esse veneno, levemente amarelado, das substancias não ativas que o acompanham, e obter um produto incolor com u TT (teor de toxicidade) de 2500 a 3000, o qual não conseguimos mais enriquecer. Quando tivemos oportunidade de obter maiores quantidades de secreção venenosa, bem fresca, fizemo-las secar por meio de congelação no alto vacuo, e assim conseguimos 20% de veneno seco e branco com um TT de 2000.

Com o emprego dos metodos que provaram ser os melhores para os preparados velhos, apenas pudemos enriquecer esse veneno ao TT de 2500 a 3000. Fizemos tambem: fracionamentos com alcool e acetona, semelhantes aos empregados por H. Wieland (2) com o veneno de *Naja*, separações pelo metodo usual com sulfato de amonio, bem como precipitações fracionadas a diversos graus de acidês, entre pH=4 até 6, por tanto perto do ponto iso-eletrico dessas proteinas venenosas. Apesar de todas as precauções tomadas, não obtivemos preparados com um TT além de 3000, sendo que as frações de cada experiencia, estudadas separadamente, eram, entre si, analogamente ativas.

Tomando como base essa experiencia, poude-se facilmente concluir que o veneno da cascavel consiste, naturalmente, de mais ou menos dois terços de uma proteina toxica, uniforme. Para remover a proteina que acompanha o principio ativo do veneno crotalico, achamos dois processos adequados:

A secreção crúa ou o veneno crú, cuidadosamente concentrado como acima foi descrito, é aquecido durante 10 minutos em soluto de pH=4,1 até 70°, pelo que sómente as proteinas neurotoxicamente inativas coagulam. Leva-se o soluto a um pH=4,6 até 5000 pelo que 40% a 50% do peso do veneno sêco se precipitam com proteina ativa. Pela adição de alcool, o rendimento póde ser melhorado; assim, consegue-se separar a atividade neurotoxica quasi que quantitativamente, em forma de uma molecula uniforme, como logo veremos. Consegue-se praticamente o mesmo, diluindo-se um soluto da mencionada materia prima com soro fisiologico e levando-se com sulfato de amonio a um grau de saturação de 0,45, o que precipita as substancias anexas e sómente muito pouco da toxina. Em seguida leva-se o soluto a um grau de saturação de 0,62, por adicionamento de mais sulfato de amonio; dissolve-se em seguida o precipitado forme. Empregámos, para esse fim, o metodo de E. J. Cohn (3), recentemente aplicado à componente proteinica da "enzima amarela" (4):

Faltava ainda verificar si o preparado obtido por estes dois metodos, com o teor de toxicidade de 2500 até 3000, representava de fato uma proteina uniforme. Empregámos, para esse fim, o metodo de E. J. John (3), recentemente aplicado à componente proteinica da "enzyma amarela" (4):

A proteina a ser examinada era precipitada com sulfato de amonio em graus de saturação crescentes e as quantidades de proteina remanescentes em solução eram determinadas para os diversos graus de saturação. Traçando-se um gráfico, no qual uma das ordenadas represente as quantidades remanescentes e a outra os logaritmos das concentrações de sulfato de amonio, resultava uma reta, no caso de se tratar de uma proteina uniforme. Aplicando esse metodo à toxina obtida pelos dois processos diferentes, acima descritos, verificamos tratar-se de uma proteina uniforme. A determinação da pureza absoluta da Crotoxina foi tambem aprovada na Suecia por Nils Gralén e The Svedberg (5) com metodos totalmente diferentes.

Curva 1 (Vide parte experimental II, 1)

Curva 2 (Vide parte experimental II, 2)

Ordenadas: mgs. de «Crotoxina» em soluto.
Abcissas: 10gs. dos graus de saturação de sulfato de amonio, cf. % da saturação completa.

Denominamos de *Crotoxina* a esta proteina, apresentada pela primeira vez em estado puro, e que representa a *toxina* insulada do *veneno crotalico*. Este nome é mais curto e suficientemente diferente de "Crotalotoxina", estipulado por Faust. Este autor deu tal nome a um produto livre de azoto ,encontrado no veneno crotalico, e que não foi possivel a nós nem a outros obter novamente.

A *Crotoxina* é uma proteina tipica, incolor, cujo teor de enxofre, de 4,0 %, é bem mais elevado que o do veneno crotalico crú. Possúi um TT (teor de toxicidade) médio de 2800 e um TL (teor de lecitinase) (1) de 170. Nem a nós nem a outros foi possivel, até hoje retirar um preparado do veneno de *Crotalus t. terrificus* com maior poder toxico. E' interessante observar que tanto o teor de enxofre como os TT e TL da Crotoxina se elevaram proporcionalmente cerca de 20% a 25% sobre os do veneno crú.

Após varios ensaios preliminares, conseguimos cristalizar a Crotoxina. Para isso, dissolvemo-la em acido acetico diluido, sob aquecimento moderado, levando com piridina o soluto ao pH=4,4. Refrigerando o soluto bem vagarosamente, a Crotoxina depositava-se nas paredes sob a forma de drusas de cristais macroscopicos. Esses consistem em laminas quadradas muito finas, que geralmente se acham agrupadas, conforme mostra o desenho anexo. Vistas de lado, mostram polarização (Figs. 1 e 2).

Cristalizando-se a Crotoxina, como foi dito, de um soluto de Crotoxina amorfa a 10%, recupera-se cerca de 80% de cristais como primeira porção. Nas seguintes recristalizações (até 5 vezes) perde-se de cada vez, cerca de 10% a 15%. A Crotoxina cristalizada tem o mesmo TT e TL que a Crotoxina amorfa (TT 2800 até 2000; TL 170 a 200) e o seu teor de enxofre é o mesmo (S=4,0%). Esses teores não se elevam com as varias recristalizações; pelo contrario, pudemos verificar que a toxicidade do preparado aquecido muitas vezes para novas recristalizações à temperatura de 55° é prejudicado embora insignificantemente.

O adicionamento de sais de zinco não é necessario para a cristalização da Crotoxina. Ao contrario dos dados de outros autores, não nos foi possivel encontrar zinco no veneno fresco, nem tambem, naturalmente, na Crotoxina cristalizada, a qual na combustão não deixa vestigios de cinzas susceptiveis de pesagem.

Outrora, tinhamos a impressão que os diferentes componentes fisiologicamente ativos dos venenos de cobra se concentrassem acumulados em um comum complexo. Depois de termos conseguido, pela primeira vez, insular uma molecula uniforme e cristalizada, altamente toxica, do veneno da cascavel, surgiu-nos a duvida sobre que proporções *todos* os efeitos fisiologicos do veneno dela seriam dependentes.

Já dissemos que as atividades neurotoxica e lecitinasica, isto é, os principios ativos preponderentes do veneno da cobra Cascavel, se acham totalmente

e na mesma proporção tanto na Crotoxina cristalizada, como no veneno crú. Portanto, essa molecula possúi os caracteristicos anteriormente considerados como pertencentes a duas substancias diferentes: não só o efeito toxico sobre o sistema nervoso como tambem a ação hemolytica ou seja a ação fermentativa sobre a lecitina dos globulos do sangue. Podia-se, assim, suspeitar de que a mesma enzima que decompõe a lecitina nos globulos vermelhos, reage analogamente sobre os lipoides dos nervos; desse modo, a ação toxica não passaria de simples efeito enzimatico. Neste caso, a Crotoxina deveria ser considerada uma enzima que reage diferentemente com os seus substratos nos diversos orgãos do corpo, o que, aliás, tambem se dá com outras enzimas. A urease, p. ex., em virtude de seu efeito enzimatico sobre a urea do sangue, é um principio altamente toxico; sua atividade neste particular corresponde aos venenos ofidicos mais ativos.

Quando examinámos o seu poder coagulante da Crotoxina sobre o sangue oxalatado, verificamos que ele havia desaparecido. Em vista disso resolvemos preparar a Crotoxina com todas as precauções possiveis, mas tambem o preparado assim obtido estava livre de principio coagulante. Acontece, porém, que o TC (teor de coagulação) do veneno crotalico crú é de somente 30 (o do veneno botropico é ao contrario, de cerca de 2000), donde se deduz que o veneno crotalico deve conter ainda uma outra molecula enzimatica. Si bem que essa não desempenhe papel importante nessa especie de veneno em comparação com a Crotoxina, parece-nos importante chamar a atenção para esse fato.

Protocolo das Experiencias

I. Preparo da Crotoxina

1. *Por meio de coagulação pelo aquecimento e precipitação perto do ponto iso-eletrico.*

15 ccs. de veneno fresco centrifugo (=3gs. de substancia sêca) foram adicionados de 36 cs. de acido cloridrico 0,1-N e 250 ccs. de agua e aquecidos à temperatura de 70º durante 10 minutos. A parte coagulada, depois de centrifugada e secada, pesava cerca de 300 mgs. e não era venenosa. À solução clara foram adicionados 21,5 ccs. de amoniaco 0,1-N, sempre agitando-se bem. O precipitado pesava, depois de centrifugado e secado no alto vacuo, 1.25 gs., o que correspondia a 42% do peso sêco do veneno crú. TT cerca de 3000; TL=165; TC=0; cinza menos de 0,2%.

3.978 mgs. de substancia (com 5,75% de humidade): 0.574 ccs. N; (29º, 702 mm.).

6,044 mgs. de substancia (com 5,75% de humidade): 0,963 ccs. N_2 (29°,702 mm.).

Achado N 16,%; 15,% (calculado sobre a substancia sêca).

(Analises de enxofre: Vide artigo 5 desta serie).

Achado S 4,05%; 4,02%.

Rotação otica em soluto fisiologico:

$$l=1 \text{ dm}, c=2,4, \alpha = -0,17°, [\alpha]^{23}_{D} = -7.1 \pm 0,9°.$$

Do soluto-mãe poude-se ainda, adicionando 6 ccs. amoniaco 0,1-N e 60 ccs. acool absoluto, obter uma fração com um teor de toxicidade de 2500. Eram 500 mgs. ou sejam 17% do peso do veneno sêco. Desta maneira poude-se obter, no total, em forma de Crotoxina amorfa, 59% da substancia solida existente na secreção das glandulas.

2 *Por meio do fracionamento com sulfato de amonio.*

10 ccs. do veneno fresco (=2gs. de veneno sêco) foram misturados com 175 ccs. de soro fisiologico e, sob forte agitação, adicionados aos poucos 150 ccs. de soluto saturado de sulfato de amonio. O grau de saturação em sulfato de amonio era então de 0,45. O *precipitado* foi centrifugado, dissolvido em agua, e êsse soluto dializado até que a agua não désse mais reação de iões de sulfato; finalmente, o soluto foi congelado e a agua, evaporada no alto vacuo. Obtiveram-se 250 mgs. (=12,5% do veneno sêco) com um TT de 2000.

O *soluto* foi novamente precipitado com mais 50 ccs. de sulfato de amonio saturado, de modo que o grau de saturação em sulfato de amonio era de 0,52. O precipitado agora obtido, depois de tratado, como acima descrito, era Crotoxina pura com um TT de 2500. Pesava 312 mgs.. Finalmente o soluto foi novamente precipitado com outros 100 ccs. de soluto saturado de sulfato de amonio, de modo que o seu grau de saturação chegou a 0,62. Essa fração, depois de elaborada, deu mais 430 mgs. de Crotoxina com um TT de 2500.

II. Precipitação fracionada da Crotoxina com Sulfato de Amonio

1) 220 mgs. de Crotoxina, obtidos de acôrdo com o metodo descrito sob 1,1, foram dissolvidos num soluto de 55 ccs. de sulfato de amonio 0,1 saturado. Cada 10 ccs. desse soluto, que correspondiam a 40 mgs. de Crotoxina, foram precipitados com diversos solutos aquosos de sulfato de amonio, de modo que o volume contido em cada frasco era de 45 ccs.. As porções de sulfato de

amonio foram escolhidas de modo que os cinco solutos tinham um grau de saturação em sulfato de amonio de 0,47; 0,50; 0,53; 0,57 e 0,61 respectivamente. Os precipitados foram, depois de algumas horas, centrifugados e dissolvidos em agua distilada e os solutos dializados contra agua até completo desaparecimento de iões de sulfato. As suspensões de Crotoxina assim obtidas foram evaporadas à temperatura ambiente, secadas sobre pentoxido de fosforo e os residuos pesados. As quantidades entre os 40 mgs. de veneno empregado em cada experiencia e as quantidades de veneno precipitado e pesado. Os pesos da Crotoxina ainda em solução, portanto, eram: 31,0; 24,1; 17,8; 10,4; 1,7 mg. a um grau de saturação de 0,47; 0,50; 0,53; 0.57; 0,61. Traçando-se um grafico, no qual as quantidades em mgs. representam as abcissas e os logaritmos dos graus de saturação em sulfato de amonio as ordenadas, obtem-se uma reta (Curva 1).

2) 180 mgs. de Crotoxina, obtidas de acôrdo com o metodo descrito sob I,2, foram divididos em quatro parcelas, cada uma de 45 mgs. e precipitadas com um soluto saturado de sulfato de amonio e agua, de modo que o volume total em cada frasco era de 45 ccs. e os graus de saturação de sulfato de amonio 0,3; 0,4; 0,5 e 0.6. Da determinação das quantidades de proteina precipitada e do calculo da remanescente no soluto resultou que 45,0; 44,8; 20,8 e 1,2 mgs. de Crotoxina a um grau de saturação de 0,3; 0,4; 0,5 e 0.6 continuaram dissolvidos. Obtivemos assim a curva 2, como acima ficou demonstrado.

III. Cristalização da Crotoxina

730 mgs. de Crotoxina amorfa foram dissolvidos a uma temperatura de 55º, em 8,5 ccs. de acido acetico a 1% e adicionados, sob agitação, de 4,5 ccs. de piridina a 1%. O soluto, que tinha um pH de 4.4, continha, portanto, 0,6% de acetato de piridina. Ao resfriar *vagarosamente* em banho-maria, iniciou-se a cristalização, depois de ± 30 minutos. No dia seguinte, a crotoxina cristalizada foi separada e secada. Deve-se notar que, sómente depois de bem lavada em agua, é possivel seca-la, pois vestigios de piridina e acido acetico aderentes a ela desnaturam em parte a proteina durante a secagem e podem reduzir o TT do preparado. 1 cc. de agua dissolve somente 2,3 mgs. de Crotoxina, de modo que se pode considerar insignificante a perda motivada pela lavagem. Nesta experiencia obtiveram-se 575 mgs. (=80%).

De 140 mgs. de Crotoxina amorfa obtivemos, depois de 5 recristalizações, 74 mgs. de Crotoxina cristalizada.

A Crotoxina cristalizada tem um TT de 2750. Ela é, como foi dito, quasi insoluvel em agua, mas bem soluvel em soluto de cloreto de sodio a 4%. Em um soluto de acetato de piridina a um pH=4.4 ela, a uma temperatura de 55º, tambem não se dissolve.

Renunciando-se, na cristalização, ao rendimento maximo em proveito de cristais perfeitos, pode-se dissolver a Crotoxina em acido acetico a 1% a uma temperatura de 40° (pelo que somente se obtem um soluto de proteina de 3 a 5%) e obter assim, depois de adicionar a respectiva quantidade de piridina a 1%, cristais bem formados, relativamente grandes.

De 140 mgs. de Crotoxina amorfa, obtidos pelo metodo descrito sob I,1 produzimos um tal preparado, cuja recristalização não requerem aquecimento além de 40°.

Depois de 5 recristalizações, obtivemos 14 mg. de Crotoxina cristalizada
Depois de 5 recristalizações, obtiveram 14 mgs. de Crotoxina cristalizada purissima, cujos valores analiticos eram os seguintes:

3,439 mgs. (secadas no alto vacuo a 100°) subst.:

6,400 mgs CO_2 1,970 mgs. H_2O

5,707 mgs. subst. (com 13,2% de humidade): 0,747 ccs. N_2 (26°,701 mm.)
7,453 mgs. subst. (" " " "): 0,980 " " (27°, " ")
5,993 mgs. subst. (" 12,4% " "): 1,834 mgs. de sulfato de benzina
16,061 mgs. subst. (" 9,1% " "): 5,188 " " " " "

Achado: C 50,77 H 6,41 N 15,86; 15,90 S 3,96; 4,03
Achado: C50,77 H6,41 N15,86; 15,90 S3,96; 4,03

RESUMO

Conseguiu-se isolar, por dois modos diferentes, a substancia neurotoxica e hemolitica do veneno crotalico, como uma proteina uniforme. A prova de uniformidade dessa substancia, que foi chamada *Crotoxina*, foi obtida pelo metodo de E. J. Cohn. A Crotoxina possúi um TT (teor de toxicidade) e um TL (teor de lecitinase) cada 25% mais elevado do que os do veneno fresco. Conseguiu-se a sua cristalização por meio da dissolução em acido acetico diluido e a adição ao soluto de piridina diluida.

A forma cristalina da Crotóxina é reproduzida por desenhos esquematicos e por microfotografias. Os valores analiticos, tanto da Crotoxina amorfa, como da cristalizada, são de C=50.77; H=6,41; N=15,90; S=4,01. O TT é de 3.000, o TL de 200, enquanto o TC desapareceu, de modo que deve haver na Crotoxina ainda uma outra substancia que origina o poder de coagulação do veneno crú.

Pela separação da Crotoxina do veneno de *Crotalus t. terrificus*, conseguiu-se, pela primeira vez, obter o componente principal em forma de cristais.

Este fato é tambem mais interessante em relação aos venenos animais de estrutura proteinica, quanto, até agora, não tinha sido possivel obter siquer um, em forma pura, muito menos sob forma cristalizada.

ZUSAMMENFASSUNG

Es gelang auf zwei verschiedenen Wegen, die neurotoxisch und hämolytisch wirksame Komponente des Klapperschlangen-Giftes in Form eines einheitlichen Proteins zu isolieren. Der Beweis fuer die Einheitlichkeit dieser Substanz, die *Crotoxin* genannt wird, wird mit der von E. J. Cohn vor 13 Jahren angegebenen Methodik erbracht. Crotoxin besitzt im Vergleich mit frischem trocknem Rohgift einen um rund 25% höheren Gift-und Lecithinase-Wert. Es liess sich durch Lösen in verdünnter Essigsäure und Versetzen der Lösung mit verdünntem Pyridin in krystallisierter Form abscheiden. Die Krystall-Form des Crotoxins wird durch schematische Zeichnung, wie durch Mikrophotographie wiedergegeben. Die Analysen-Werte des amorphen, wie des krystallisierten Crotoxins sind C=50,77; H=6,41; N=15,90; S=4,01. Der Giftwert beträgt 3.000, der Lecithinase-Wert 200, während der Koagulations-Wert verschwunden ist, sodass also im Crotalus-Gift noch eine zweite Substanz vorhanden sein muss, der die Koagulations-Wirkung des Rohgiftes zukommt.

Es ist mit der Isolierung des Crotoxins aus dem *Crotalus t. terrificus*-Gift erstmalig geglückt, eine der Komponenten der Schlangengifte in krystallisierter Form zu erhalten. Das ist auch im Hinblick auf alle anderen tierischen Giftstoffe ähnlicher Art mit Proteinstruktur von Interesse, da auch von diesen noch keines in reiner, geschweige krystallisierter Form erhalten worden ist.

BIBLIOGRAFIA

1. *Slotta, C. H. & Szyszka, G.* — Mem. Inst. Butantan **11**:109. 1937.
2. *Wieland, H. & Konz, W.* — Sitz-Ber. math.-nat. Abt. bayr. Akad. Wiss.: 177. 1936.
3. *Cohn, E. J.* — Physiol. Rev. **5**:349. 1925.
4. *Kuhn, R. & Desnuelle, P.* — Ber. dtsch. chem. Ges. **70**:1907. 1937.
5. *Gralén, N. & The Svedberg* — Biochemical J. **32**:1375. 1938.

(Trabalho da Secção de Quimica e Farmacologia Experimental do Instituto Butantan, recebido em maio de 1938. Publicado como Nota Previa, em alemão, in Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft 71: 1938. Dado à publicidade em junho de 1938)

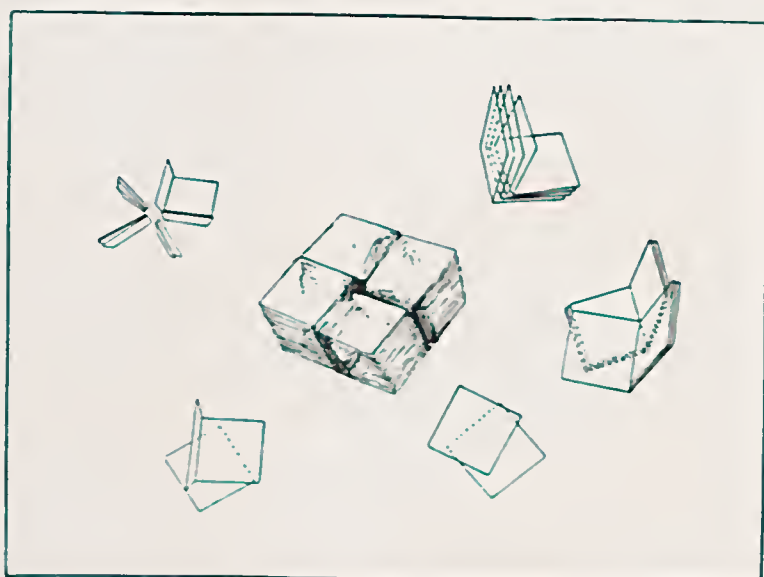



Fig. 1
Crotoxina (desenho esquematico) cristalisada.

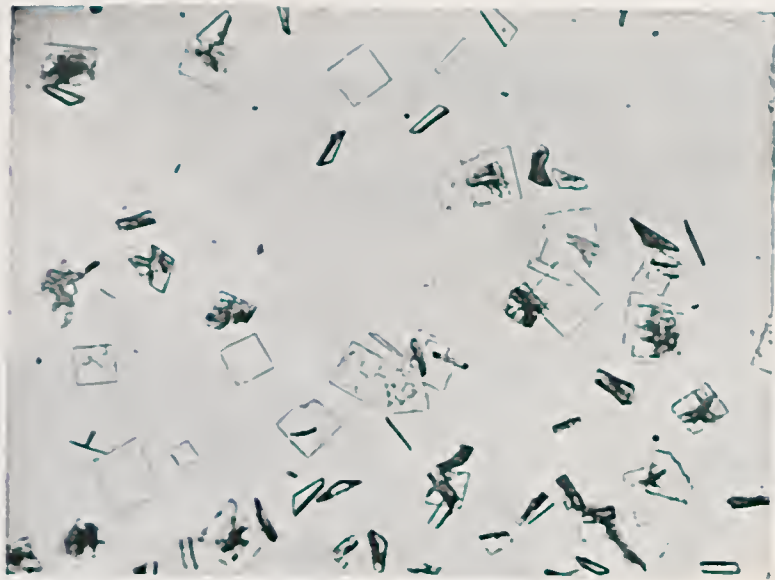
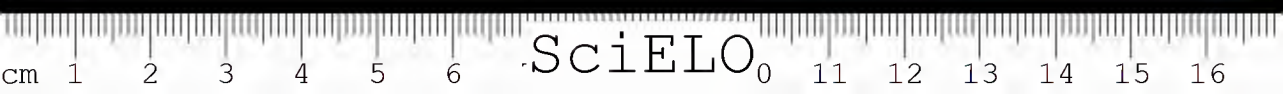



Fig. 2
Crotoxina (microfotografica) 1 x 96.

612.31412:615.94:598.122.

ESTUDOS QUIMICOS SOBRE OS VENENOS OFIDICOS

5. Determinação quantitativa dos componentes que contêm enxofre

POR

C. H. SLOTTA & W. FORSTER

Como já haviamos provado na segunda comunicação dessa nossa serie (1), uma parte do enxofre contido nos venenos ofidicos se apresenta em forma de pontes -S-S- e que são de capital importancia na atividade dos venenos. Interessava saber agora, depois de conseguida (2) a apresentação pura do veneno da cobra Cascavel (*Crotalus t. terrificus*), quais os componentes sulfurados que estivessem nele contido. No estudo que se segue, podemos demonstrar em que proporção o enxofre do veneno é distribuido entre os diversos amino-acidos com enxofre dessa proteina. Hidrolizamos Crotoxina amorfa (2) com uma mistura (3) de acido cloridrico e acido formico, afim de determinar as substancias de teor de enxofre contidas no hidrolizado.

Primeiramente, examinámos o teor de cistina (-S-S-) dos hidrolizados da Crotoxina pelo metodo mencionado por Sullivan (4) por ser a cistina (-S-S-) o amino-acido sulfurado que geralmente ocorre. Êsse metodo compreende somente o amino-acido livre e não quando se acha ligado em peptidas nem os seus homologos. Com o emprego desse metodo foram apurados 13,1% de cistina (-S-S-), i. é, 87,5% do enxofre total que se eleva na Crotoxina a 4,0%. Surgiu, então, a questão quais seriam os demais componentes com enxofre que ainda existem no veneno e, para sua resolução, fizemos a seguinte preponderação, que se torna mais compreensivel por meio da seguinte tabela:

São apreendidos	por meio dos metodos de			
	Folin	Sullivan	Baernstein 1.ª titulação	2.ª t.
1) Cistina (-S-S-)	sim	sim	sim	não
2) Outros amino-acidos com ligação (-S-S-)	sim	não	sim	não
3) Metionina	não	não	não	sim
4) Outros amino-acidos substituidos no atomo de enxofre	não	não	sim	não
5) *Tiolactonas*	sim	não	não	sim

Enquanto o metodo de Sullivan, como anteriormente dito, só responde à cistina (-S-S-), o metodo de Folin (5), tambem muito usado, abrange ainda sistemas disulfatos-tiões. Em nosso caso, encontrámos, por meio desse metodo 13,3% de cistina (-S-S), quer dizer, no limite de erro a mesma quantidade que é achada pelo metodo de Sullivan; daí sobresai que na Crotoxina não existem outras ligações -S-S- além da cistina (-S-S-). Tambem si o enxofre aparecesse em uma ligação completamente nova a quimica das proteinas, como tiolactona, êle seria apurado pelo metodo de Folin, mas não pelo de Sullivan, de modo que se pode tambem excluir esta possibilidade, em vista desses dois teores serem praticamente iguais.

A subsequente suposição mais provavel era que, além da cistina (-S-S-) existisse ainda na Crotoxina a metionina. $CH_3.S.CH_2.CH_2.CH(NH_2).COOH$. Para determinar isso, pudemos, de acôrdo com o metodo de Baernstein (6), proceder como segue: hidroliza-se a proteina como acido iodidrico, pelo que o grupo metila se separa do enxofre, podendo ser determinado quantitativamente. No hidrolizado, a cisteina (-SH), produzida pela ação redutora do acido iodidrico da cistina (-S-S-), permite a titulação com biodato de potassio, enquanto que a homocisteina formada da metionina, forma nesse soluto acido um anel tiolactonico, que somente se desfaz em um soluto fracamente alcalino. Alcalinizando-se, pois, com amoniaco sob certas precauções tecnicas, obtem-se o sal de homocisteina com grupo -SH livre, que combina com outro igual por dehidrogenação, formando uma ponte -S-S-, o que se produz pela adição de quantidade medida de tetrationato. Pela titulação com biodato obtem-se o tiosulfato assim formado, do que resulta com grande exatidão a quantidade de metionina no soluto de metionina empregada. 9,10 mgs.. Recuperamos, assim, em provas em branco, p. ex. de 9,15 mgs.. Essa determinação volumetrica da metionina parece-nos muito mais precisa para pequenas quantidades de proteina do que a determinação do iodeto de metila formado pela ação do acido iodidrico, com o qual diversas vezes, por exemplo no caso da insulina cristalizada, obtivemos teores por demais altos. Determinámos, por este motivo, com o metodo de titulação de

Baernstein, não só cistina (-S-S-) como tambem a metionina e encontrámos para cistina (-S-S-) 13,2, isto é, o mesmo valor como com os metodos de Sullivan e Folin. Para a metionina resultou 1,36%, o que correponde a 7,3% do enxofre na Grotoxina. Qualquer outros amino-acidos substituidos no enxofre e ainda desconhecidos, mas em todo o caso imaginaveis, teriam sido encontrados com a cistina (-S-S-), si aplicadas as condições de experiencia de Baernstein. 'Pois, somente a posição δ do enxofre na metionina permite a formação da cadeia tiolactonica e, possibilitando assim a determinação separada da metionina ao lado da cistina (-S-S-).

Outrossim, pode deduzir-se o seguinte: do teor da metionina que, com muita precisão, se pode determinar na Crotoxina, resulta um peso molecular minimo de 11.000; pelas determinações do peso molecular de proteinas feitas por Svedberg é muito provavel que êsse teor multiplicado por 3 ou por 6, represente o verdadeiro peso molecular da Crotoxina. Calculando-se, entretanto, com o peso molecular minimo de 33.000, o enxofre esclarecido se distribúi na proporção de 18 restos de cistina (-S-S-), para 3 de metionina. Essas cifras permitem sua subordinação, sem obrigatoriedade, as cifras fundamentais deduzidas por M. Bergmann (7) dos estudos da periodicidade de amino-acidos em proteinas, isso é nesse caso $18 = 2^1 \times 3^2 : 3 = 2^0 \times 3^1$.

Tendo, porém, a molecula de Crotoxina o peso molecular de 33.000, resulta do teor de enxofre, determinado com exatidão, de 4,0% um teor de 41 atomos de enxofre, dos quais 36 + 3 existem como cistina (-S-S-) e metionina. A analise, ainda a ser mencionada, dos componentes contendo enxofre, de um outro veneno, nos mostrou que não ha decomposição pelo metodo de hidrolise de Baernstein e que os teores de cistina (-S-S-) mais metionina, assim esclarecidos, podem corresponder, plenamente, ao teor de enxofre da analise de combustão. Tendemos, por isso, mais para a opinião que ainda existam, entre os 41 atomos de enxofre da Crotoxina, 2 em uma ligação que ainda não foi possivel reconhecer. Entretanto, deve-se salientar que aqui não se trata de um outro composto com ligação -S-S- ou -SH, nem de uma tiolactoma e nem de um tiol alquilado no enxofre.

Como demonstrámos anteriormente (1), o enxofre, contido no veneno de *Bothrops jararaca*, de ação tão diferente, tambem se apresenta como pontes -S-S- que são de capital importancia na ação. Por êsse motivo esclarecemos tambem os componentes desse veneno, os quais contêm enxofre. Acontece, porém, que o veneno botropico, apesar do adicionamento de acido formico ao acido cloridrico ou sulfurico, não pode ser hidrolizado sem que se dê forte decomposição, motivo pelo qual tivemos de abandonar a determinação da cistina (-S-S-) pelos metodos de Sullivan e Folin.

Durante a hidrolise com acido iodidrico não aparecem as dificuldades citadas, de modo que pudemos determinar bem a cistina (-S-S-) e metionina pelo

metodo de Baernstein (6). Não utilizamos o veneno crú, mas uma fração purificada, com com toda a atividade neurotoxica. Encontrámos na media 5,73% de cistina (-S-S-) e 1,08% de metionina, do que resulta um teor de enxofre de 1,75% para o veneno de *Bothrops jararaca,* enquanto que o teor medio das analises de combustão era de 1,74%.

Descrição das experiencias

Tornou-se absolutamente necessario para as analises dos venenos uma cuidadosa, porém energica secagem. Essa conseguimos somente depois que as substancias foram secadas durante duas horas a uma temperatura de 100°, sob uma pressão de 0,01 mm. sobre pentoxido de fosforo até peso constante. O teor de toxicidade não sofreu com isso. Os teores das analises em % se referem aos preparados assim obtidos, completamente livres de agua.

Com a questão de secagem dessas proteinas ativas, altamente higroscopicas, é de interesse geral, expomos as nossas experiencias, feitas na secagem de venenos sob diversas condições, em curvas de perda de peso, que certamente não requerem mais explicações. Como já achou du Vigneaud (3), no caso da insulina, os teores de enxofre podem baixar de até 0,3% si a secagem for insuficiente. Os venenos de cobra são igualmente ou talvez mais higroscopicos do que a insulina.

I. *Crotoxina amorfa, pura (TT = 3.000, TL = 165, TC = 0)*

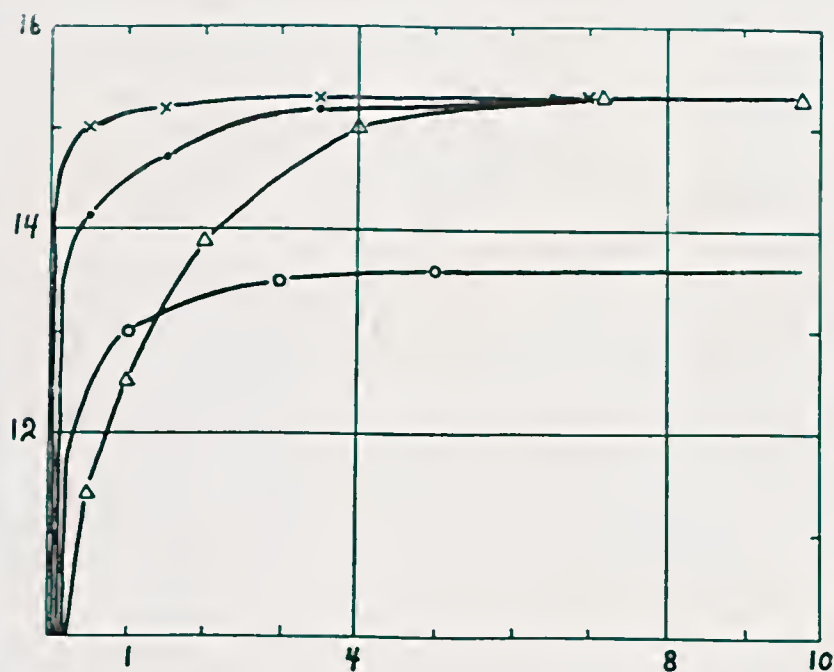
1) Determinação do teor de enxofre segundo Schöberl (8).
43,793 mgs. substancia deram 15.608 mgs. de sulfato de benzidina
22,872 " " " 8,087 " " " " "

Em cada caso a substancia deixou somente vestigios de cinza.

S = 4,05; 4,02. Media: S = 4,03%.

2) Determinação dos amino-acidos que contêm enxofre.

a) Cistina (-S-S-) determinada como cisteina (-SH), conforme Folin (5) e Sulivan (4)

55,44 mgs. de substancia foram dissolvidos num balãosinho de boca esmerilhada em 5,8 ccs. de acido cloridrico concentrado; 6,2 ccs. de acido formico puro foram adicionados e, depois de adaptados a um tubo de refluxo com junta esmerilhada, aquecidos em banho de oleo durante 48 horas a uma temperatura de 130 a 140°. Depois de exames preliminares poude-se verificar que a hidrolise, após êsse tempo, era completa. Em seguida o soluto foi, a uma pressão de

Curvas de secagem do veneno de *Crotalus t. terrificus*, contendo 15.3% de humidade.

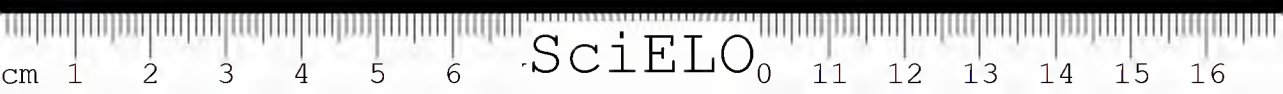
Ordenada: perda de peso em %

Abcissa: tempo de secagem em horas.

—×— Secagem no alto vacuo de 0.01 mm., a 100°C. sobre P_2O_5

—●— " " " " " 0.01 mm., a 54°C. " "

—△— " " " " " 0.01 mm., a 25°C. " "

—○— Secagem numa corrente de ar seco sob a pressão de 55 mms., a 54°C.

50 ms.. evaporado à secura em banho-maria e o residuo dissolvido em 3 ccs. de agua. Depois de levar esse soluto, com a adição de sóda caustica 0,1 N, a um pH de 3,5, êle foi colocado em um balão graduado de 10 ccs..

Avaliação colorimetrica segundo FOLIN (5) — Num balão volumetrico de 25 ccs. foram colocados 1 cc. do soluto acima mais 1 cc. de acido sulfurico 0,5 N e 1 cc. de agua. Do mesmo modo tratou-se um soluto padrão de 8,071 mgs. de Cistina (-S-S-) pura, em 10 ccs. de acido sulfurico 0,5 N, do qual 1 cc. mais 2 ccs. de agua foi empregado.

A cada um desses balões foram adicionados os seguintes reagentes: a) 1 cc. de um soluto de sulfito de sodio a 10% (20 g Na_2 SO_3.7 H_2O para 100 cs. dissolvidos com agua); b) depois de deixar 1 minuto: 5 ccs. de um soluto de carbonato de sodio a 18% (18 g Na_2 CO_3, anidro para 100 cc. dissolvidos em agua); c) 1 cc. de um soluto de sulfato de litio a 10% (11,6 g Li_2 SO_4.H_2O para 100 ccs. dissolvidos em agua); d) 2 ccs. do "reagente para acido urico", segundo Folin, diluido, quanto às indicações originais, à razão de 1:6. Esse reagente fora preparado de tungstato de sodio da firma Schering-Kahlbaum (Na_2WO_4.2H_2O) mais uma vez por nós purificado pelas ultimas indicações de Folin (5); e) depois de agitado e estacionado durante 5 minutos: 13 ccs. de um soluto de sulfito de sodio a 3% (6 g Na_2 SO_3.7 H_2O para 100 ccs. dissolvidos em agua).

Em seguida foi feita a avaliação colorimetrica com um colorimetro Dubosq de dois degraus (Leitz). Para compensar a côr propria do hidrolizado, empregou-se um soluto, feito de acôrdo com o que devia ser determinado, mas que continha 2 ccs. de agua em vez do reagente de Folin. 30 mms. de camada de soluto a ser examinado correspodiam a 27,83 mms. de camada do padrão que continha 0,807 mgs. de cistina (-S-S-). O soluto a ser determinado continha, pois, por ccs. 0,75 mgs. de cistina (-S-S-), i.é. o teor de cistina (-S-S-) do veneno era de 13,5%.

Avaliação colorimetrica segundo SULLIVAN (4) — 2 ccs. de hidrolizado, neutralizado como acima descrito, que correspondiam, portanto, a 11,09 mgs. de veneno, foram colocados em um Erlenmeyer de 25 ccs.. Simultaneamente, um soluto de 1,558 mgs. de cistina (-S-S-) e 5 ccs. de acido cloridrico 0,1N, destinado a soluto comparativo sofreu o mesmo tratamento, que damos a seguir.

Ao hidrolizado e ao soluto padrão foram adicionados: a) 2 ccs. de um soluto de cianeto de sodio alcalino (5 gs. cianeto de sodio para 100 cs. dissolvidos (9) com soda caustica-1N.) Depois de bem agitadas, as soluções ficaram paradas durante 10 minutos; b) 1 cc. de um soluto a 0,5% do sal de sodio do acido 4-sulfurico da nafto-quinona 1,2 recem-recristalizado. Agitou-se durante 10 segundos; c) 5 ccs. de um soluto de sulfito de sodio a 10% (20 g Na_2 SO_3.7 H_2O para 100 ccs. dissolvidos com soda caustica 0,5-N. Os solutos ficaram parados durante 30 minutos; d) 1 cc. de um soluto de hodrosulfito de sodio a 2%

(2 g Na_2 S_2 O_4 da firma Schering-Kahlbaum para 100 ccs., dissolvidos em soda caustica 0,5 N).

Os dois solutos foram colorimetrados no aparelho mencionado, sendo que a côr propria do soluto a ser examinado foi compensada por um soluto obtido da mesma forma, que, porém, continha 1 cc. de agua em vez do reagente indicado sob b). 30 mms. da camada do soluto a ser examinado correspondiam a 27.41 mms. do soluto padrão, do que resultou um teor de cistina (-S-S-) do veneno de 13,0%.

Pela segunda vez foram, como acima dito, hidrolizados 42,12 mgs. de Crotoxina durante 48 horas. Do hidrolizado levado a 10 ccs., 2 ccs. foram empregados para a reação conforme Folin e comparados do modo descrito com 1 cc. do soluto padrão, que continha 0,807 mgs. de cistina (-S-S-), 20 mms. da camada desse soluto desconhecido correspondiam a 27,50 do soluto padrão; o teor de cistina (-S-S-) na Crotoxina é, portanto, de 13,2%. Para a reação de Sullivan foram utilizadas 2 ccs. do soluto mencionado, que foram comparados com 3 ccs. do soluto padrão, que continha 0,3115 mgs. de cistina (-S-S-). 30 mms. da camada do soluto em questão correspondiam a 35.51 mms. do soluto padrão do que resulta um teor de cistina (-S-S-) na Crotoxina de 13,1%.

b) Cistina (-S-S-) e metionina determinadas segundo Baernstein (6).

179,54 mgs. de Crotoxina foram colocados em um balãosinho com boca esmerilhada de 25 ccs. e foram conservados com acido iodídrico que continha 1% de hipofosfito de sodio, sob refluxo e condução de gaz carbonico purissimo em fervura, em banho de oleo de 150°, durante 5 horas. O hidrolizado foi, depois desta operação, concentrado a 3 ccs. e adicionado com um cristal de hipofosfito de sodio (NaH_2 $PO_2.H_2O$) e fervido durante um minuto. O balão, ainda quente, foi fechado com uma rolha esmerilhada e resfriado. Simultaneamente encheu-se um balão volumetrico de 25 ccs. com azoto purissimo e transferido para êste por um funil pequeno o hidrolizado. O balão da reação foi lavado tres vezes com acido cloridrico a 4%, livre de oxigenio e saturado com azoto, sendo que o balão foi completado com o mesmo acido a 25 ccs.. O soluto tinto de amarelo claro não continha iodo livre como mostrava a prova de amido.

Afim de determinar a cistina (-S-S-), foram colocados 10 ccs. desse soluto em um balão de 25 ccs. com junta esmerilhada e adicionados um cristal de iodeto de potassio, uma quantidade de soluto de amido e um pequeno excesso de um soluto de biiodado de potassio (KHJ_2 O_6). O iodo em excesso não utilizado na oxidação da cisteina (-SH) para cistina (-S-S-) foi titulado com tiosulfato 0.01N. Em duas titulações foram necessarios 7,91 e 7,96 ccs. de soluto de biiodato de potassio, do que se pode calcular para a quantidade total da Crotoxina empregada um teor de cistina (-S-S-) de 13.2% e 13.3%, respectivamente.

Para determinar a metionina foram adicionados ao soluto incolor 3 gotas de soluto de fenolftaleina a 0,5% e 2 ccs. de soluto de tetrationato de alcali 0,01N, que havia sido feito, pouco antes, de partes iguais de soluto de tiosulfato de sodio 0,01N ($Na_2 S_2 O_3$) e biiodato de potassio ($KHJ_2 O_6$ com iodeto de potassio e um pouco de acido cloridrico diluido. Sobre o balão, com o soluto assim preparado, foi colocada uma junta esmerilhada, na qual se achava um funil conta-gotas com torneira e um tubo lateral para o vacuo. Depois de diminuida a pressão até mais ou menos 50 mms., o vacuo foi fechado e pelo funil acrescentando amoniaco concentrado, assim que o soluto tomasse uma côr vermelha forte. Depois de aberta, com todo o cuidado, a torneira do vacuo, o amoniaco em excesso evaporou, espumando. Fechado novamente o soluto vermelho foi abandonado durante 15 minutos, permitindo-se em seguida a entrada de ar pela torneira. Acidulou-se rapidamente com 10 ccs. de acido cloridrico a 10%. O tiosulfato assim formado foi titulado com um soluto de biiodato de potassio, 0,01N ($KHJ_2 O_6$). Foram utilizados 0,68 cs. de soluto de biiodato de potassio, donde se dá um teor de metionina na Crotoxina de 1,41%.

Uma segunda experiencia foi iniciada com 80,54 mgs. de Crotoxina, executada como descrito. O hidrolizado, porém, foi somente completado a 10 cs., dos quais cada 5 cs. foram utilizados para cada das duas marchas de titulação. Nas primeiras titulações foram necessarios 4,70 e 4,68 cs. de soluto de biiodato de potassio, correspondentes a 13,05 e 13,00% de cistina (-S-S-). Nas segundas titulações foram utilizados 0,38 e 0,40 cs. de biiodato de potassio, o que corresponde a 1,31 e 1,37% de metionina.

Resumo dos teores de Crotoxina assim obtidos:

S: 4,02; 4,05% (Crotoxina amorfa).
3,96; 4,03% (Crotoxina cristalizada)
Teor medio: 4,01 ± 0,05%

Cistina: 13,2; 13,5% (Folin)
13,0; 13,1% (Sullivan)
13,0; 13,1; 13,2; 13,3% (Baernstein)
Teor medio: 13,2 ± 0.3% correspondentes a 87.6 ± 2,3% do enxofre total.

Mitionina: 1,31; 1,37; 1,41% (Baernstein)
Teor medio: 1,36 ± 0,05% correspondentes a 7,2 ± 0,3% do enxofre total.

II. *Fração do veneno de* **Bothrops jararaca,** *purificada e neurotoxi-mente de completa atividade.*

1. *Determinação do teor do enxofre total, segundo Schöberl* (8).

32,710 mgs. Subst. resultaram 4,945 mgs. sulfato de benzidina.
29,770 " " " 4,610 " " " "
Achado S = 1,72; 1,76.

2. *Determinação de cistina (-S-S-) e metionina, segundo Baernstein* (8).

198,81 mgs. de veneno foram hidrolizados como descrito para a Crotoxina, e o soluto obtido levado a 25 ccs.. Para a marcha de titulação foram utilizados 2 vezes 10 ccs. de soluto. Na titulação da cistina (-S-S-) foram necessarios 3,80 e 3,79 ccs. e na da metionina 0.55 e 0,60 ccs. biiodato de potassio, o que corresponde a um teor de cistina (-S-S-) de 5,75 e 5,73% e um teor de metionina de 1.03 e 1,12%.

RESUMO

Determina-se o teor de cistina (-S-S-) e o teor de metionina na Crotoxina, segundo os metodos de Folin, Sullivan e Baernstein que dão, respectivamente, 13,2 e 1,36%. Esclareceu-se, assim, 95% do enxofre contido na Crotoxina nos seus modos de ligação. É de supôr que, pelo peso molecular provavel de 33.000, baseado no teor de metionina, existam na Crotoxina 18 moleculas de Cistina (-S-S-) e 3 moleculas de metionina. Os 5% do teor de enxofre que faltam deveriam então pertencer a dois outros componentes contendo enxofre (10).

Uma fração do veneno *Bothrops jararaca* com o total da atividade continha 1,74% de enxofre. Essa substancia deu 5,73% de cistina (-S-S-) e 1.08 de metionina, do que se poderia calcular um teor de enxofre de 1,75%.

ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe der Methoden von Folin, Sullivan und Baernstein wird der Gehalt des Crotoxins an Cystin (-S-S-) und Methionin zu 13,2% beziehungsweise 1,36% ermittelt. Damit sind rund 95% des im Crotoxin enthaltenen Schwefels (4,01%) in ihrer Bindungsart aufgeklärt. Es ist wahrscheinlich, dass bei einem aus dem Methionin-Gehalt zu vermutenden Molekelgewicht von 33.000, im Cro-

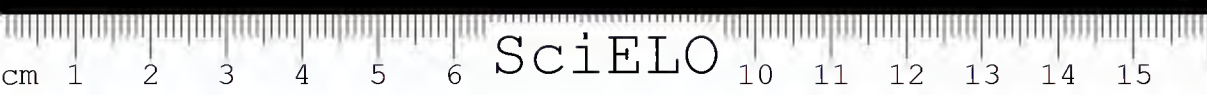
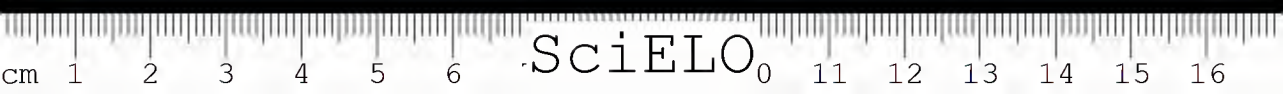
toxin 18 Cystin (-S-S-) und 3 Methionin-Molekeln sind. Die fehlenden 5% des Schwefelgehaltes müssten 2 andeven schwefelhaltigen Molekeln angehön (10).

Eine vollaktive Fraktion des *Bothrops jararaca*-Giftes enthiel 1,74% Schwefel. Diese Substanz ergab 5,73% Cystin (-S-S-) und 1,08% Methionin, woraus sich ein Schwefelgehalt von 1,75% errechnem würde.

BIBLIOGRAFIA

1. *Slotta, C. H. & Fraenkel-Conrat, H. L.* — Mem. Inst. Butantan **11**:121. 1937.
2. *Slotta, C. H. & Fraenkel-Conrat, H. L.* — Mem. Inst. Butantan **12**: . 1938.
3. *Miler, G. L. & Vigneaud, V. du* — J. Biol. Chem. **118**:101. 1937.
4. *Sullivan, M. X.* — Publ. Health Rep., Washington, suppl. (78). 1929.
5. *Folin, O. & Marenzi, A. D.* — J. Biol. Chem. **83**:103. 19029.
6. *Baernstein, H. D.* — J. Biol. Chem. **106**:453. 1934.
7. *Bergmann, M. & Niemann, K.* — Science **86**:187. 1937.
8. *Schöberl, A.* — Ztsch. angew. Chem. **50**:334. 1937.
9. Trabalhámos na execução da reação de Sullivan num soluto um pouco mais fortemente alcalino que de costume, pelo que se pode evitar o emprego de tamponagem aconselhado por outros. Reconhecemo-nos gratos ao colega Sr. M. X. Sullivan pela sua indicação particular nesse sentido.
10. O peso molecular da Crotoxina é de 30500, segundo as determinações de Gralén, N. & The Svedberg — Biochemical J. 32:1375. 1938.

(Trabalho da Secção de Quimica e Farmacologia Experimentais do do Instituto Butantan, recebido em maio de 1938. Publicado como Nota Previa, em alemão, in Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft 71: 1938. Dado à publicidade em junho de 1939).

595.44

ALGUMAS ARANHAS DE S. PAULO E SANTA CATARINA

POR

C. DE MELLO-LEITÃO

Na ultima remessa de aracnideos que me chegaram às mãos, e pertencentes às coleções do Instituto Butantan, haviam as seguintes especies novas que passo a descrever:

Fam. BARYCHELIDAE

Gen. **Psalistops** SIMON

Psalistops nigrifemuratus, sp.n.

(Figs. 1 a 3)

♂ — 23 mm.

Patas	Femur	Patela-tibia	Protarso	Tarso	Total
I	9	12	7	5	33 mm.
II	9	11	7	5	32 mm.
III	8	9	7	5	29 mm.
IV	10	12	11	6,5	39,5 mm.

Todo o animal fulvo-cervino escuro, com os femures das patas denegridos.

Patas armadas de abundantes espinhos robustos, irregularmente dispostos; as tibias anteriores (I e II) com 3-3 espinhos apicilares inferiores. Comoro ocular duas vezes mais largo do que longo, com um tufo de longos pêlos em seu bordo anterior. Olhos posteriores em fila recurva, os medios ovais e quasi contiguos aos laterais. Olhos anteriores grandes, os medios um pouco menores, formando uma linha fortemente procurva. Olhos laterais anteriores muito maiores do que os laterais posteriores. Rastelo das queliceras fraco.

Palpos do femur direito com um espinho apicilar interno; patela pouco mais longa do que larga, levemente dilatada para o apice, com um espinho subapicilar interno; tibia bem mais espessa na base, afilando-se para o apice, com duas filas internas de 3-6 robustissimos espinhos; tarso muito pequeno, bilobado; bulbo piriforme, muito dilatado na base, de estilete recurvo para diante (Fig. 3).

Hab.: Burí, S. Paulo.

Tipo: No. 269, na coleção do Instituto Butantan.

Fam. DINOPIDAE

Gen. Dinopis

Dinopis pallidus, sp.n.

(Fig. 4)

♀ — 12 mm.

Patas	Femur	Patela-tibia	Protarso	Tarso	Total
I	10	10	9	3	32 mm.
II	9,5	9,5	8,2	2,8	30 mm.
III	7	6,5	4,1	1,9	19,5 mm.
IV	8,5	8	5,2	2	23,7 mm.

Cefalotorace pardo-acinzentado claro, com uma linha branca mediana e ornado de tres manchas negras de cada lado, marginais, ao nivel dos tres ultimos pares de patas. Olhos medios anteriores com uma orla de pêlos curtos, avermelhados, densos; entre os olhos ha um tufo de longos pêlos eretos. Patas pardo-acinzentadas, com alguns pontos escuros, irregularmente dispostos. Abdome pardo acinzentado, com pequenas cerdas baciliformes esparsas, apresentando de cada lado u'a mancha alongada negra, de contorno irregular (Fig. 4).

Cefalotorace baixo, de perfil dorsal plano. Abdome com dois pequenos tuberculos no terço mediano, com um sulco transverso pouco atrás desses tuberculos e muito rugoso logo adiante do tuberculo anal, que é muito grande, com vestigios de anelação e ornado de pelos baciliformes. Patas inermes, muito delgadas.

Hab.: Ribeirão Pires, S. Paulo.

Tipo: No. 358, na coleção do Instituto Butantan.

Fam. LYCOSIDAE

Gen. **Lycosa**

Lycosa sericovittata, sp.n.

(Figs. 5 e 6)

♂ — 15 mm.

Patas	Femur	Patela-tibia	Protarso	Tarso	Total
I	8	9	6	3,8	26,8 mm.
II	7	8	6	3,2	24,2 mm.
III	7	7	5,5	3	22,5 mm.
IV	7	9,5	9	4	29,5 mm.

Cefalotorace alto, regularmente arredondado dos lados em seus dois terços posteriores, bem mais estreito e direito em sua porção cefalica. Area dos olhos posteriores mais larga do que longa, mais larga atrás do que adiante. Olhos anteriores iguais, equidistantes, em fila nitidamente procurva. Tibias anteriores (I e II) com 2-2-2 espinhos inferiores; protarsos com 2-2 inferiores e dois apicilares de cada lado.

Cefalotorace castanho-negro, ornado de uma larga faixa mediana creme, revestida de pêlos sedosos, ocupando toda a porção cefalica, estreitando-se um pouco para trás; de cada lado essa faixa é limitada por uma fimbria de pêlos sedosos brancos e apresentando nos angulos do clipeo um tufo de pêlos semelhantes. Junto à margem ha uma estreita linha do mesmo tom que a faixa mediana. Abdome negro. O dorso é quasi inteiramente ocupado por uma faixa longitudinal esbranquiçada. Nessa faixa ha duas manchas castanhas no terço anterior, seguidas de tres angulos pardos (Fig. 5). Ancas fulvo-escuras. Esterno, laminas maxilares, peça labial e ventre negros, uniformes. Patas negras.

Palpos: femur direito, tres vezes mais longo do que largo, com 1-1-3 espinhos robustos; patela bem mais longa do que larga, pouco curva, com um espinho no terço medio da face interna: tibia com longos pelos em tufo, sem apofise apicilar; tarso quasi igual à tibia-patela, de bulbo basilar saliente (Fig. 6).

Hab.: Paramirim, S. Paulo.

Tipo: No. 344, na coleção do Instituto Butantan.

Fam. ACANTHOCTENIDAE

Gen. Acanthoctenus Keyserling, 1877

Acanthoctenus mammiferus, sp.n.

(Figs. 11 a 13)

♂ — 18 mm.

Patas	Femur	Patela-tibia	Protarso	Tarso	Total
I	10	14	8	3	35 mm.
II	8	11	7,5	2,5	29 mm.
III	7	8	6,5	2,5	24 mm.
IV	9	11	9	3,2	32,2 mm.

Cefalotorace pardo-claro com duas faixas escuras e duas estreitas faixas marginais negras; os olhos orlados de negro. Região ocular com abundantes pêlos sedosos cremes. Patas pardas, irregularmente manchadas de escuro. Abdome pardo claro com seis pares de pequenas manchas negras, os tres pares posteriores unidos por linhas transversais curvas, negras, de convexidade anterior (Fig. 11). Ventre pardo-claro, quasi creme, sombreado dos lados e atrás. Cribelo bipartido, de borda posterior negra.

Cefalotorace baixo, regularmente curvo dos lados, pouco estreitado adiante. Sulco toracico mediano muito alongado, profundo. Todos os olhos proximamente iguais, sendo apenas bem menores os laterais anteriores (Fig. 12), que formam com os medios posteriores uma fila procurva. Area dos olhos medios quadrada, os quatro olhos iguais. Peça labial muito mais longa do que larga, de borda anterior regularmente arredondada e ultrapassando muito o meio das laminas maxilares. Margem inferior do sulco ungueal das queliceras com tres dentes robustos e equidistantes; a margem superior com tres dentes junto ao angulo, o medio bem maior. Tibias anteriores (I e II) com 2-2-2-2-2-2 espinhos inferiores, 1-1-1-1-1 externos e 1-1-1-1 internos; protarsos com 2-2-2 inferiores e 1-1-1 de cada lado, com densas escopulas que chegam até a base. Cribelo bipartido. Fiandeiras anteriores tres vezes mais espessas do que as posteriores.

Epigino grande, transverso, sem crista quitinosa mediana e sem cristas laterais espiraladas (portanto de um tipo diverso dos dois outros), apresentando em suas placas simetricas duas robustas eminencias mamilares (Fig. 13).

Hab.: S. Paulo (?)

Tipo: No. 368, na coleção do Instituto Butantan.

Nota: A quem tenha lido minha Monografia da familia será facil identificar esta especie: pelo desenho, ela está entre *A. exilis* (do qual apresenta os

olhos orlados de negro) e *A. Marshii* (do qual tem o desenho abdominal e as linhas escuras do cefalotorace). No quadro das femeas esta especie ocupará, pela forma do seu epigino, uma posição inteiramente àparte.

Fam. GNAPHOSIDAE

Gen. **Zelotes**

Zelotes scutatus, sp.n.

(Figs. 14 e 15)

♂ — 6 mm .

Patas	Femur	Patela-tibia	Protarso	Tarso	Total
I	2,5	3,8	2	1,6	9,9 mm.
II	2,4	2,8	2	1,2	8,4 mm.
III	2	2,4	1,6	1,2	7,2 mm.
IV	3	3,8	2,8	1,6	11,2 mm.

Cefalotorace, esterno, peça bucal, laminas maxilares, patas, queliceras e palpos cor de mogno; abdome esbranquiçado, com um pequeno escudo basilar dorsal e a região epigastrica do mesmo colorido do cefalotorace, e revestido de pelos trigueiros; os pelos baciliformes das patas são tambem denegridos.

Cefalotorace baixo, pouco estreitado adiante, com o sulco toracico alongado e profundo. Olhos posteriores despigmentados, em fila quasi direita, os medios triangulares e subcontiguos, maiores do que os laterais, que são circulares e separados dos medios cerca de meio diametro. Olhos anteriores em fila direita, os medios negros e maiores do que os laterais, separados uns dos outros cerca de meio diametro dos medios. Clipeo pouco mais alto do que o diametro dos olhos medios anteriores. Area dos olhos medios paralela, quasi duas vezes mais longa do que larga. Peça labial paralela, quasi alcançando o apice das laminas, de borda livre direita; laminas maxilares muito excavadas em sua borda externa alem da inserção dos palpos. Patas anteriores inermes; os seus tarsos e protarsos com uma escopula rala de pelos baciliformes seriados. Patas posteriores sem escopulas nem tufos de sustentação sub-ungueais; tibias e protarsos irregularmente espinhosos. Fiandeiras inferiores tres vezes mais longas e mais robustas do que as superiores, separadas cerca de seu diametro, com uma coroa apicilar de grossas fusulas. Abdome com pequeno escudo basilar dorsal, revestido de pelos sedosos pouco abundantes.

Palpos do femur direito e curto; patela cilindrica; tibia do comprimento da patela mas muito mais espessa com robusta apofise apicilar interna romba;

tarso pouco maior do que a tibia, de bulbo complexo, ocupando quasi todo o tarso (Fig. 15).

Hab.: S. Paulo

Tipo: No. 354, na coleção do Instituto Butantan.

Fam. CLUBIONIDAE

Gen. Corinna

Corinna penicillata, sp.n.

♂ — 12 mm.

Patas	Femur	Patela-tibia	Protarso	Tarso	Total
I	6	7,5	4,2	2,8	20,5 mm.
II	5	7	4	2,2	18,2 mm.
III	5	6	4	2	17 mm.
IV	6	7	6	2	21 mm.

Cefalotorace fulvo, de região cefalica denegrida; patas fulvas bem como os palpos; queliceras, peça labial e laminas maxilares fuvo-denegridas; esterno e ancas cor de mogno. Abdome cinzento-escuro, quasi negro, com um escudo basilar alongado, cor de mogno; ventre castanho escuro; na região epigastrica ha uma grande mancha denegrida e duas faixas claras.

Cefalotorace pouco elevado; a região cefalica muito convexa. Tegumentos "chagrinés". Olhos posteriores em fila levemente procurva, os medios menores, separados entre si quasi dois diametros e a cerca de tres diametros dos laterais. Olhos anteriores em fila direita, os medios duas vezes maiores do que os laterais, separados um do outro um diametro e a meio diametro dos laterais. Area dos olhos medios mais larga do que alta, os anteriores bem maiores. Clipeo mais baixo do que os olhos medios anteriores. Margem inferior do sulco ungueal das queliceras com tres dentes iguais, a superior com tres, dos quais o medio muito mais robusto. Tibias I com 2-2-2-2-2-2 espinhos inferiores e protarsos com 2-2 e densa escopula; tibias II com 2-2-2-2-2 espinhos inferiores.

Palpos: femur curvo, levemente dilatado para o apice, com tres curtos espinhos dorsais subapicilares; patela mais longa do que larga, inerme; tibia maior do que a patela, com dois longos espinhos internos e robusta apofise apicilar

externa, chanfrada e com pequena apofise apicilar interna, recurva; tarso com uma apofise basilar; o bulbo volumoso, de estilete longo e espirilado.

Hab.: Eugenio Lefèvre, S. Paulo.

Tipo: No. 320, na coleção do Instituto Butantan.

(Trabalho de colaboração do Museu Nacional, Rio, recebido em setembro de 1938. Dado à publicidade em junho de 1939).

Mem. Inst. Butantan
Vol. XII — 1938-39

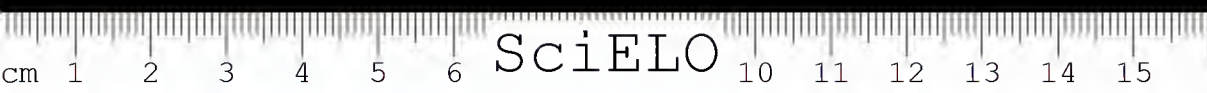
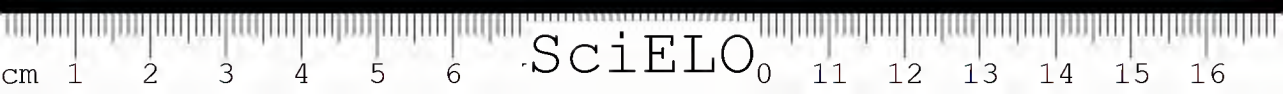



Fig. 1
Psalistops nigrifemuratus.

Fig. 2
Comoro ocular de *P. nigrifemuratus.*

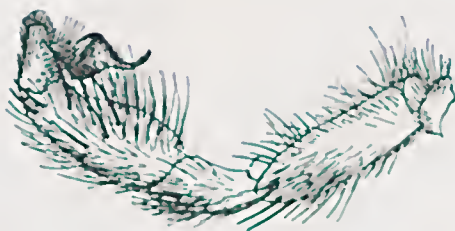



Fig. 3
Palpo de *P. nigrifemuratus.*

Fig. 4
Dinopis pallidus (dorso e perfil).

Fig. 5
Lycosa sericovittata.

Mem. Inst. Butantan
Vol. XII — 1938-39

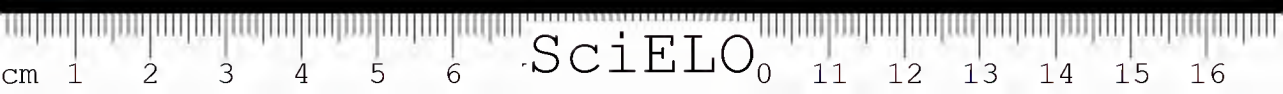



Fig. 6
Palpo de *Lycosa sericovittata.*

Fig. 7
Ctenus semiornatus.

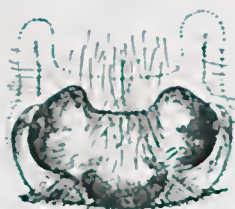



Fig. 8
Epigino de *Ctenus semiornatus.*

Fig. 9
Isoctenus masculus.

Fig. 10
Palpo de *Isoctenus masculus.*

Fig. 11
Acanthoctenus mammiferus.

Mem. Inst. Butantan
Vol. XII — 1938-39

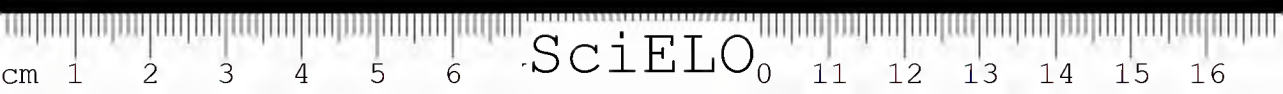
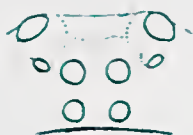



Fig. 12
Olhos de *A. mammiferus*

Fig. 13
Epígino de *A. mammiferus*

Fig. 14
Zelotes scutatus

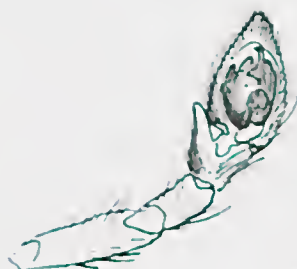



Fig. 15
Palpo de *Z. scutatus*

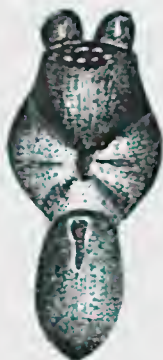



Fig. 16
Corinna penicillata

Fig. 17
Palpo de *C. penicillata*